



Departamento Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Efectos de la función ovárica en la vía de señalización del NO y
participación de los canales K_{Ca} y K_{ATP} en la regulación del
tono vascular. Influencia del envejecimiento.**

TESIS DOCTORAL
Ana Sagredo Rodríguez
2009



Mercedes Ferrer Parra, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que D^a Ana Sagredo Rodríguez ha realizado bajo su dirección el Trabajo **“Efectos de la función ovárica en la vía de señalización y participación de los canales K_{Ca} y K_{ATP} en la regulación del tono vascular. Influencia del envejecimiento”** como Tesis para alcanzar el Grado de Doctor.

Madrid 11 de Mayo 2009

Fdo.: Dra. Mercedes Ferrer Parra

ESTE TRABAJO HA SIDO FINANCIADO CON
PROYECTOS SUBVENCIONADOS POR:

- El fondo de investigaciones sanitarias (PI 051767)
- Fundación Mutua Madrileña (MMA-06/08)

*“Si buscas resultados distintos,
no hagas siempre lo mismo”*

Albert Einstein

A mis padres

A mis I,B,M,C

A ti, hayati

Agradecimientos

En primer lugar quiero dar las gracias a mi directora de Tesis, la Dra. Mercedes Ferrer, quien me ofreció la posibilidad de formar parte de su grupo de investigación cuando la ciencia era una alternativa más. Ella me animó, enseñó, guió y ayudó hasta convertirla en vocación y en mi forma de vida de estos últimos años. Espero que esté tan satisfecha de mi trabajo, como yo agradecida por el suyo.

Gracias al Departamento de Fisiología, por acogerme y ofrecerme la posibilidad de entrar en el mundo de la investigación y la docencia. Agradezco mucho el trabajo realizado por cada uno de sus miembros y en particular el de la Dra. Gloria Balfagón. Gracias de manera especial a Lara, Rosa y Aina, que no sólo han sido compañeras de laboratorio sino también buenas amigas.

Gracias a la Dra. M^a Carmen Fernández Criado, directora del animalario, y a sus técnicos por el cuidado de los animales de experimentación. Gracias al Departamento de Bioquímica y al Departamento de Farmacología y Terapéutica por facilitarme los instrumentos necesarios para la realización de muchos de los experimentos aquí presentados. Gracias a Antonio Luengo, servicio de informática de la Facultad de Medicina, por ayudarme siempre que lo he necesitado.

Gracias a toda mi familia, en especial a mis padres porque ellos son los que han hecho esto posible, por escucharme, por los sabios y necesitados consejos, por hacer de mí quien soy. Gracias a mis hermanos, a mi nueva familia y a mis amigos, por estar tan pendientes de mí y de mis avances. Gracias por ser los mejores.

Gracias a Jorge por quererme y entenderme.

En definitiva GRACIAS a todas las personas que han confiado en mí, que me han creído capaz y por supuesto a quienes me han dado la oportunidad. Gracias de todo corazón, porque sin vosotros esta Tesis nunca hubiera salido adelante

Índice

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	10
1.- ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL	11
1.1.- Túnica Íntima	13
1.2.- Túnica Media	14
1.3.- Túnica Adventicia	15
2.- ÓXIDO NÍTRICO	16
2.1.- Síntesis, óxido nítrico sintasas (NOS)	16
2.2.- Mecanismos de acción	19
2.2.1.- Guanilato ciclasa soluble (sGC)	19
2.2.2.- Proteína quinasa G (PKG)	20
2.2.3.- Via NO/cGMP/PKG	22
3.- ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	25
3.1.- Síntesis	26
3.2.- Antioxidantes	30
3.2.1.- Superóxido dismutasa (SOD)	30
3.2.2.- Catalasa	32
3.2.3.- Glutación peroxidasa	32
4.- CANALES DE POTASIO	33
4.1.- Canales de potasio dependientes de Ca^{2+} (BK_{Ca} , IK_{Ca} , SK_{Ca})	33
4.2.- Canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP})	36
4.3.- Canales de potasio dependientes de voltaje (K_{V})	38
4.4.- Canales de potasio inward-rectifying (K_{ir})	39
5.- HORMONAS SEXUALES FEMENINAS	40
5.1.- Síntesis	40
5.2.- Efectos vasculares. Mecanismos de acción	44
6.- ENVEJECIMIENTO	49
6.1.- El envejecimiento y la función vascular	49
6.2.- El envejecimiento y las hormonas sexuales	50
OBJETIVOS	53

MATERIALES Y MÉTODOS	55
1.- Animales de experimentación	56
2.- Presión Arterial	56
3.- Niveles séricos progesterona, estrona, 17 β -estradiol y testosterona	56
4.- Reactividad vascular	57
5.- Liberación de NO endotelial	59
6.- Expresión de proteínas	60
6.1.- Preparación de la muestras	60
6.2.- Electroforesis	60
6.3.- Transferencia y detección inmunológica	61
7.- Producción de aniones superóxido	62
7.1.- Localización de aniones superóxido	62
7.2.- Cuantificación de aniones superóxido	62
8.- Actividad de SOD, PKG, PKA y PKC	63
9.- Formación de cGMP	64
10.- Soluciones y fármacos	64
11.- Análisis estadístico	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
EFFECTO DE LA OVARIECTOMÍA Y ENVEJECIMIENTO SOBRE:	67
1.- Peso corporal y uterino	67
2.- Niveles séricos de hormonas sexuales endógenas	67
3.- Presiones sanguíneas	71
4.- Contenido de actina	72
EFFECTO DE LA OVARIECTOMÍA EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR EN ANIMALES JÓVENES	75
1.- Respuesta a ACh	75
2.- Participación del NO endotelial	76
2.1.- Participación del NO endotelial en la respuesta a ACh	76
2.2.- Reactividad vascular a NPS	77
2.3.- Expresión de eNOS y liberación de NO endotelial	78

2.4.- Niveles de cGMP	81
2.5.- Participación de la sGC en la respuesta a ACh	82
3.- Aniones superóxido	83
3.1.- Localización <i>in situ</i> de aniones superóxido	84
3.2.- Expresión Cu/ZnSOD y MnSOD. Actividad de SOD	84
3.3.- Papel de los aniones superóxido en la respuesta a ACh	86
3.4.- Papel de los aniones superóxido en la respuesta a NPS	87
4.- Proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG)	88
4.1.- Participación de la PKG en la respuesta a ACh	90
4.2.- Participación de la PKG en la liberación de NO endotelial	91
4.3.- Participación de la PKG en la respuesta a NPS	92
5.- Participación de los canales BK _{Ca} y K _{ATP}	93
5.1.- Expresión de los canales BK _{Ca}	93
5.2.- Expresión de los canales K _{ATP}	95
5.3.- Participación de los canales BK _{Ca} y K _{ATP} en la respuesta a ACh	95
5.4.- Participación de los canales BK _{Ca} y K _{ATP} en la respuesta a NPS	97
5.5.- Participación de los canales BK _{Ca} y K _{ATP} en la liberación de NO endotelial	98
5.6.- Reactividad vascular al abridor de canales BK _{Ca} . Participación de la PKG y aniones superóxido	99
EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR	103
1.- Respuesta a ACh	103
2.- Participación del NO endotelial	104
2.1.- Participación del NO endotelial en la respuesta a ACh	104
2.2.- Reactividad vascular a NPS	105
2.3.- Expresión de eNOS y liberación de NO endotelial	106
2.4.- Niveles de cGMP	108
2.5.- Participación de la sGC en la respuesta a ACh	109
3.- Aniones superóxido	110
3.1.- Localización <i>in situ</i> de aniones superóxido	111

3.2.- Expresión de Cu/ZnSOD y MnSOD. Actividad de SOD	111
EFFECTO DE LA OVARECTOMÍA EN LA REGULACIÓN	
DEL TONO VASCULAR EN ANIMALES VIEJOS	114
1.- Respuesta a ACh	114
2.- Participación del NO endotelial	115
2.1.- Participación del NO endotelial en la respuesta a ACh	115
2.2.- Reactividad vascular a NPS	116
2.3.- Expresión de eNOS y liberación de NO endotelial	117
2.4.- Niveles de cGMP	119
2.5.- Participación de la sGC en la respuesta a ACh	120
3.- Aniones superóxido	121
3.1.- Localización <i>in situ</i> de aniones superóxido	122
3.2.- Expresión Cu/ZnSOD y MnSOD. Actividad de SOD	122
4.- Proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG)	124
4.1.- Participación de la PKG en la respuesta a ACh	125
4.2.- Participación de la PKG en la liberación de NO endotelial	126
5.- Participación de los canales BK _{Ca} y K _{ATP}	127
5.1.- Expresión de los canales BK _{Ca}	127
5.2.- Expresión de los canales K _{ATP}	129
5.3.- Participación de los canales BK _{Ca} y K _{ATP} en la respuesta a ACh	130
5.4.- Participación de los canales BK _{Ca} y K _{ATP} en la respuesta a NPS	132
5.5.- Participación de los canales BK _{Ca} y K _{ATP} en la liberación de NO endotelial	133
5.6.- Reactividad vascular al abridor de canales BK _{Ca} . Participación de la PKG	134
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	140

Abreviaturas

5-HT: serotonina	HSD: hidroxisteroide dehidrogenasa
AA: ácido araquidónico	HSP20: 20 KDa heat shock-related protein
AC: adenilato ciclasa	IK_{Ca}: K _{Ca} de conductancia intermedia
ACh: acetilcolina	IL-1: interleuquina 1
ACTH: hormona adrenocorticotropa	iNOS: NOS inducible
AD: androstenediona	IP3: inositol 1,4,5-trifosfato
ADP: adenosín difosfato	K⁺: potasio
Ang: angiotensina II	K_{ATP}: canal de K ⁺ dependiente de ATP
ATP: adenosin trifosfato	K_{Ca}: canal de K ⁺ dependiente de Ca ²⁺
AUC: porcentaje del área bajo la curva	KCl: cloruro potásico
BH₄: tetrahidrobiopterina	KHS: solución de Krebs-Henseleit
BK: bradikina	K_{ir}: canal K ⁺ inward-rectifying
BK_{Ca}: K _{Ca} de larga conductancia	K_v: canal K ⁺ dependiente de voltage
Ca²⁺: calcio	L-Arg: L-arginina
cAMP: adenosín monofosfato cíclico	LH: hormona luteinizante
cGMP: guanosín monofosfato cíclico	L-NAME: N(G)-nitro-L-arginine metilester
CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina	MLC: cadena ligera de miosina
CO: monóxido de carbono	MLCK: quinasa de la MLC
CO₂: dióxido de carbono	MnSOD: SOD mitocondrial
COX: ciclooxigenasa	NA: noradrenalina
Cu/ZnSOD: SOD citosólica	NADPH: nicotín-adenín dinucleótido fosfato
DAF-2 DA: DAF-2 diacetato	NF-KB: factor nuclear KB
DAF-2: 4,5-diaminofluoresceína	nNOS: NOS neuronal
DAF-2T: triazolfuoresceína	NO: óxido nítrico
DAG: diacilglicerol	NOS: NO sintasa
DHEA: dehidroepiandrosterona	NPS: nitroprusiato sódico
DMSO: dimetilsulfóxido	O₂⁻: anión superóxido
e⁻: electrón	ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
E1: estrona	OH⁻: radical hidroxilo
E2: 17β-estradiol	ONOO⁻: peroxinitrito
ecSOD: SOD extracelular	PDGF: GF derivado de plaquetas
EDHF: factor hiperpolarizante derivado de endotelio	PGI₂: prostaciclina
EDRF: factor relajador derivado de endotelio	PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
eNOS: NOS endotelial	PKA: quinasa dependiente de cAMP
ER: receptor estrogénico	PKB: quinasa B
ERK: quinasa extracelular	PKG: quinasa dependiente de cGMP
ET-1: endotelina 1	PLC: fosfolipasa
FAD: flavín-adenín dinucleótido	ROS: especies reactivas de oxígeno
FHS: hormona estimulante de folículo	SEM: error estándar de la media
FMN: flavín mononucleótido	sGC: guanilato ciclasa soluble
GF: factor de crecimiento	SK_{Ca}: K _{Ca} de pequeña conductancia
GnRH: hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas	SOD: superóxido dismutasa
GPB: ER acoplado proteína G	T: testosterona
GTP: guanosín trifosfato	TGF-β: factor de crecimiento tumoral β
H₂O₂: peróxido de hidrógeno	TNF-α: factor de necrosis tumoral α
HE: hidroetidina	TXA₂: tromboxano A ₂
	VASP: vasodilatory-stimulated phosphoprotein
	VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

Resumen

Datos epidemiológicos han puesto de manifiesto que el cese de la función ovárica, producido por el envejecimiento o por alguna patología, va acompañado de alteraciones cardiovasculares, por lo que se ha atribuido a las hormonas sexuales femeninas un papel protector sobre la función vascular. De hecho, aunque existen numerosos estudios mostrando la reversión -por 17 β -estradiol especialmente- de algunas alteraciones producidas por la pérdida de función ovárica, existe gran controversia sobre los efectos de las terapias sustitutivas estrogénicas en mujeres postmenopáusicas. Hace algún tiempo se recomendaba la aplicación de estas terapias para prevenir las alteraciones cardiovasculares. Sin embargo, estudios más recientes han mostrado riesgos, más que beneficios, sobre la función vascular. Además, la utilización de estas terapias en pacientes con menopausia precoz no ha logrado revertir las alteraciones vasculares que presentan. Estos datos indican la existencia de factores distintos a los estrógenos, y dependientes de la función ovárica, implicados en la regulación de la función vascular. Por todo ello, sería importante conocer los mecanismos intracelulares por los que la función ovárica regula el tono el vascular, tanto en la edad adulta como en el envejecimiento.

El óxido nítrico (NO) desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la función vascular, directamente y a través de la formación de cGMP y activación de la proteína kinasa dependiente de cGMP (PKG). A su vez, estas moléculas regulan la actividad de los canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca}) y de ATP (K_{ATP}), que también participan en la regulación del tono vascular. Sin embargo, no existen estudios funcionales y sistemáticos sobre la posible modificación de la vía de señalización del NO-cGMP-PKG- K_{Ca} / K_{ATP} por la ausencia de función ovárica y/o envejecimiento. Por tanto, el objetivo de esta Tesis ha sido analizar en aorta de rata el efecto de la función ovárica, y su modulación por el envejecimiento, sobre la participación de la vía de señalización en la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina (ACh).

Para ello, se utilizaron aortas de rata hembra Sprague-Dawley de 6 y 20 meses de edad, control (fase estro) y ovariectomizada (en edad prepúber) en las que se valoró: (i) la expresión de eNOS, SODs, subunidades α y β de los canales K_{Ca} y las subunidades Kir6.1 y SUR2B de los canales K_{ATP} ; (ii) la producción de

NO, aniones superóxido y cGMP; (iii) la actividad de PKG, PKA, PKC y SODs, (iv) la participación del NO, cGMP, PKG y canales K_{Ca} y K_{ATP} en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh; (v) la regulación de los K_{Ca} por PKG, y (vi) la participación de la PKG y los canales K_{Ca} y K_{ATP} en la liberación de NO.

Los resultados obtenidos muestran que la pérdida de función ovárica en animales jóvenes aumenta la producción de aniones superóxido, no modifica la liberación de NO y disminuye la formación de cGMP; aún así, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh se mantiene, probablemente, por la existencia de mecanismos compensatorios como el incremento en la actividad de PKG y de los canales K_{Ca} .

El envejecimiento, en ratas con la función ovárica intacta, no modifica la liberación de NO pero disminuye la formación de cGMP; la respuesta inducida por ACh se encuentra disminuida a pesar de que la actividad de PKG es muy superior a la observada en ratas jóvenes. Disminuye la expresión y el efecto vasodilatador de los canales K_{Ca} y aumenta el de los canales K_{ATP} .

La pérdida de función ovárica mantenida hasta la senectud causa una disminución en la liberación de NO y un aumento en la producción de aniones superóxido, aunque también la expresión y actividad de las SODs están incrementadas. Sin embargo, no existe modificación de los niveles de cGMP y actividad de PKG, manteniéndose la respuesta inducida por ACh.

Globalmente, estos resultados muestran la complejidad e interacciones entre los elementos de la vía de señalización del NO, sin olvidar las posibles interacciones con otras vías de señalización.

Los resultados también indican que alteraciones en un determinado punto en la vía de transducción de señales pueden desarrollar diferentes mecanismos de compensación destinados a mantener la función vascular.

Introducción

1.- ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL

El aparato circulatorio tiene como finalidad distribuir la sangre oxigenada y los nutrientes a todos los órganos, así como recoger los productos de desecho y dióxido de carbono (CO₂), para su posterior eliminación. Por lo tanto, el aparato circulatorio participa en el mantenimiento de la homeostasis vascular, ofreciendo unas condiciones de supervivencia y función óptimas.

El aparato circulatorio consta de una bomba muscular, el corazón, y de dos sistemas de vasos sanguíneos: (1) la circulación menor o pulmonar, que transporta la sangre a los pulmones y la recoge de ellos, y (2) la circulación mayor o sistémica, que transporta la sangre oxigenada al resto del organismo. En ambos casos, la sangre bombeada por el corazón atraviesa una serie de vasos sanguíneos de calibre decreciente y es recogida por otra serie de vasos de calibre creciente, los cuales difieren en su morfología y función (Tabla 1).

Tipos de vasos	Diámetro (Ø)	Principales características
Arterias	↑↑	<ul style="list-style-type: none"> -pared vascular muy desarrollada (↑↑ fibras musculares, ↑ fibras elásticas), -mantiene altas presiones;
Arteriolas	↑	<ul style="list-style-type: none"> -pared vascular más fina (↑ fibras musculares, ↑ fibras elásticas), -resistencia periférica;
Capilares Vasos Pequeños	↓↓	<ul style="list-style-type: none"> -pared vascular muy fina (↓ fibras musculares, ↓ fibras elásticas), -presencia de poros → INTERCAMBIO -Forman amplias redes en todos los tejidos;
Vénulas	↑	<ul style="list-style-type: none"> -pared vascular fina (↑ fibras musculares, ↑ fibras elásticas), -recogen la sangre de los capilares;
Venas	↑↑	<ul style="list-style-type: none"> -pared vascular delgada (↑ fibras musculares, ↑↑ fibras elásticas), -gran capacidad de dilatación, -reservorio de sangre.

Tabal 1: Principales características de los distintos tipos de vasos sanguíneos.

La pared arterial contribuye al mantenimiento de la homeostasis vascular ya que responde activamente a determinados estímulos; es por tanto importante conocer la estructura y organización de la pared arterial.

La pared arterial en general, y en las arterias de conductancia en particular, consta de un endotelio, tejido elástico, tejido muscular y tejido conjuntivo, que se organiza formando capas definidas.

En la pared arterial se distinguen tres capas concéntricas: (1) una Túnica Íntima, formada por células endoteliales; (2) una Capa o Túnica Media formada principalmente por fibras musculares lisas y elásticas; y (3) una Túnica Adventicia constituida por fibras de colágeno orientadas longitudinalmente, fibroblastos y algunas fibras elásticas y musculares dispersas. Separando la túnica íntima de la túnica media, se encuentra la lámina elástica interna, una capa fenestrada de elastina y lo mismo sucede entre la túnica media y la túnica adventicia con la lámina elástica externa (Rhodin, 1980) (Figura 1).

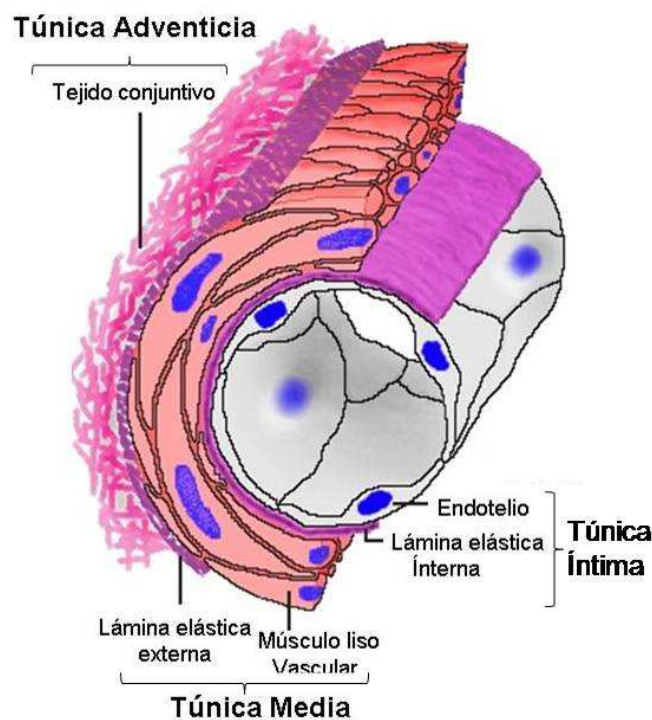


Figura 1: Estructura de la pared arterial.
(Tomado de <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140>).

1.1.- Túnica Íntima

Es la capa que reviste la superficie interna del vaso; está constituida por un epitelio plano y simple de células orientadas longitudinalmente y estrechamente unidas, llamado endotelio vascular, una lámina basal y tejido conjuntivo laxo subendotelial. Las células endoteliales no sólo constituyen una barrera mecánica entre la sangre y la pared sino que constituyen uno de los principales órganos de regulación vascular. Su posición anatómica les permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y la pared vascular (Lüscher y Vanhoutte, 1990). Las células endoteliales poseen acciones exocrina, paracrina y autocrina, y están implicadas en: la liberación de agentes vasoactivos (Tabla 2), en la respuesta inmune, en el control de la proliferación del músculo liso subyacente y en la adhesión y extravasación de los leucocitos (Lüscher y Vanhoutte, 1990; Rubanyi y Botelho, 1991).

Está confirmado que estas células, son sensibles a cambios hemodinámicos y que la acción combinada de los factores que libera el endotelio mantiene la homeostasis vascular, al igual que el desequilibrio de los mismos ocasiona diversas patologías cardiovasculares (Lüscher y Vanhoutte, 1990).

Agentes Vasoactivos	
Vasodilatadores	Óxido Nítrico (NO) Prostaciclina (PGI ₂) Factor hiperpolarizante de endotelio (EDHF) Peróxido de hidrógeno, etc.
Vasoaconstrictores	Endotelina (ET-1) Angiotensina II (AII) Trombosaxo A ₂ (TXA ₂) Prostaglandinas (PGE ₂ , PGF _{2α}) Aniones sueróxido, etc.
Moduladores de crecimiento	Factor de crecimiento tumoral-β (TGF-β) Factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) Interleuquinas y quimiocinas NO, AII, ET-1, PGI ₂ , etc.
Moduladores de inflamación	Especies reactivas de oxígeno Interleuquinas y quimiocinas Molécula de adhesión leucocito endotelial (ELAM) Molécula de adhesión intracelular (ICAM) Molécula de adhesión vascular (VCAM), etc.

Tabla 2: Factores liberados por el endotelio vascular

1.2.- Túnica Media

La túnica media está formada por una capa muy marcada de fibras musculares lisas vasculares orientadas circularmente, con fibras reticulares asociadas a ellas, y un pequeño número de fibras elásticas individuales. Las fibras musculares lisas de la túnica media son las responsables del mantenimiento de la tensión muscular, al regular el diámetro de la luz del vaso. A diferencia del músculo esquelético y cardíaco, el músculo liso vascular es capaz de mantener una fuerza tónica durante largos períodos de tiempo y con un bajo coste energético.

Las células de músculo liso vascular son largas y fusiformes, de núcleo alargado, unidas entre sí por uniones en hendidura. Contienen haces de actina y miosina, responsables de la contracción, por el desplazamiento de los filamentos de actina, sobre los de miosina. En la contracción del músculo liso se pueden distinguir dos componentes, una contracción fásica y una contracción tónica (Rasmussen *et al*, 1987). La primera, se caracteriza por una respuesta rápida y transitoria, modulada por el sistema calcio-calmodulina (Dillon *et al*, 1981), mientras que la segunda, se regula por la caldesmosina (Smith *et al*, 1987), una proteína contráctil asociada al dominio actina-miosina.

La contracción depende de un incremento intracelular de calcio (Ca^{2+}), que se une a la calmodulina; el complejo calcio-calmodulina cataliza la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina al combinarse con la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), lo que permite la formación de puentes cruzados en la miosina y la interacción de éstos con los filamentos de actina, provocando la contracción. La energía para la contracción proviene de la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP; Alberts *et al*, 1992). El incremento intracelular de Ca^{2+} puede ser debido a la estimulación de la entrada de Ca^{2+} extracelular principalmente por la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje localizados en la membrana plasmática o a la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático, por la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC) que estimula la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), aumentando la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), que es quien estimula la liberación del Ca^{2+} (Timmermans *et al*, 1987; Bülbring y Tomita, 1987; Minneman, 1988). Así mismo, la relajación muscular provoca un aumento del diámetro de la luz y tiene lugar cuando disminuye la concentración

intracelular de Ca^{2+} . En estas condiciones, la calmodulina se disocia de la MLCK, inactivándola y los grupos fosfatos son eliminados posteriormente por la fosfatasa de la miosina. Existen además receptores de membrana en las células musculares lisas para multitud de agentes vasoactivos que activan, inhiben o modulan los mecanismos de contracción/relajación.

1.3.- Túnica Adventicia

Constituida por fibroblastos y haces de colágeno, así como una por red laxa de fibras elásticas delgadas, vasos y terminaciones nerviosas (Tabla 3) (Li y Dickles, 1992; Boeckxstaens *et al*, 1997; Marín y Balfagón, 1998). Los neurotransmisores liberados desde la terminación nerviosa, a través de sus receptores específicos, van a ejercer su acción sobre distintos tipos celulares postsinápticos de la pared vascular y, por lo tanto, actúan como moduladores del tono vascular. La naturaleza química y la función de los distintos neurotransmisores liberados, depende de la especie y lecho vascular sobre el que actúan (Tabla 3). Además, la túnica adventicia es una fuente de radicales libres de oxígeno, como el anión superóxido (O_2^-), que afectan tanto a la función del músculo liso como a la de las células endoteliales, regulando de esta manera también el tono vascular (Pagano *et al*, 1995). Así pues, la regulación del flujo sanguíneo en el lecho vascular es un proceso complejo en el que participan factores hormonales, metabólicos, nerviosos y endoteliales.

Inervación	Neurotransmisor	Receptor	Localización	Efecto
Adrenérgica	NA	α -adrenérgicos β -adrenérgicos	CML CLM	Vasoconstricción Vasodilatación
Colinérgica	Ach	Múscarinicos (M_1 - M_5)	CE CML	Vasodilatación Vasoconstricción
Nitrérgica	NO	-	-	Vasodilatación
Serotoninérgica	5-HT	5-HT ₁ 5-HT ₇	CE y CML	Vasoconstricción
Peptidérgica	Péptido vasointestinal Neuropeptido Y CGRP Sustancia P	VPAC Y ₁ -Y ₅ RAMP/CRLR NK1	CE y CML	Vasoconstricción Vasoconstricción Vasodilatación Vasodilatación
Purinérgica	ATP	P1-P2	CE y CML	Vasodilatación

Tabla 3: Tipos de inervaciones y efectos de sus neurotransmisores en la regulación vascular. NA: noradrenalina; Ach; acetilcolina; NO: óxido nítrico; 5-HT: serotonina; CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina; ATP: adenosín trifosfato.

2.- ÓXIDO NÍTRICO

En la vasculatura, el óxido nítrico (NO) aparece, en primer lugar, como un mediador de la relajación del músculo liso dependiente de endotelio en respuesta a acetilcolina (ACh) denominado EDRF (*endothelial derivated relaxing factor*; Furchogott y Zawadzki, 1980) que resultó ser químicamente equivalente al NO descrito posteriormente (Ignarro *et al*, 1987^a; Ignarro *et al*, 1987^b; Palmer *et al*, 1987; Vallance *et al*, 1989).

El NO tiene las siguientes características: (1) es un gas con una solubilidad moderada en agua, alcanzando, en condiciones normales, la saturación a una concentración de 1,9 mM (Shaw y Vosper, 1977); (2) es un radical libre con un electrón desapareado que puede intervenir en varias reacciones, actuando como oxidante débil o reductor (Kanner *et al*, 1991); (3) el NO puede reaccionar con el O₂⁻ y formar peroxinitrito (Beckman *et al*, 1990); (4) su carga neutra le permite una difusión libre a través de las membranas biológicas (Welch y Loscalzo, 1999).

Por otra parte, el NO posee funciones biológicas en todos los sistemas del organismo, ya que modula el flujo sanguíneo, procesos de proliferación (Tao *et al*, 2006) y diferenciación celular (Kawahara *et al*, 2005), participando así en diferentes mecanismos homeostáticos.

El NO es uno de los factores mejor estudiados, conociéndose los mecanismos que regulan su síntesis, liberación y metabolismo, así como su mecanismo de acción a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) del músculo liso vascular y consiguiente vasodilatación.

2.1.- Síntesis, óxido nítrico sintasas (NOS)

La producción de NO, proviene de la oxidación enzimática de cinco electrones de un N-guanidino del aminoácido L-arginina (L-Arg), por la acción de la NO sintasa (NOS), utilizando como donador de electrones el nucleótido nicotín-adenín fosfato reducido (NADPH) (Figura 2).

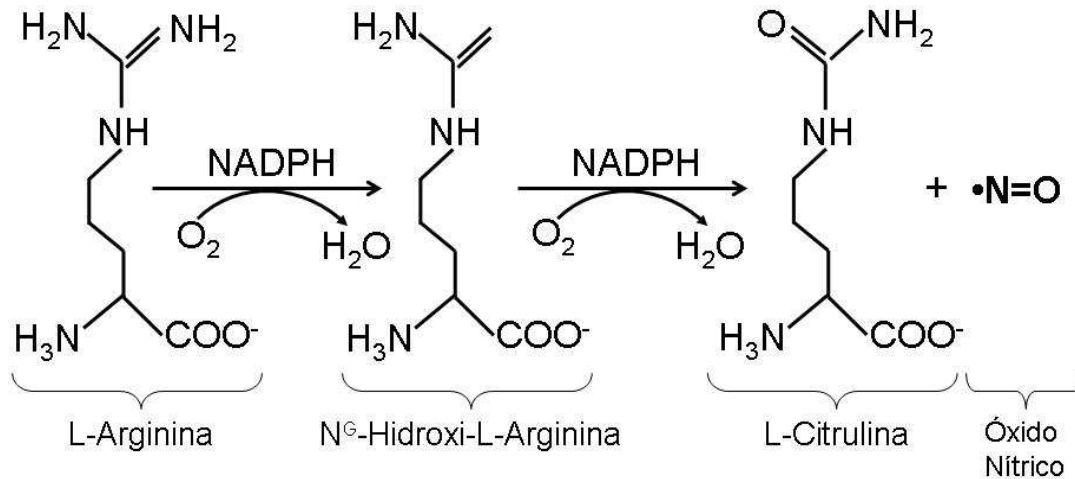


Figura 2: Biosíntesis del NO a partir de L-Arginina.

Se han identificado tres isoformas distintas de la NOS codificadas por genes diferentes, localizados en distintos cromosomas, con diferente regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores. A todas las isoformas se las considera dímeros en su forma activa, pero en realidad son tetrámeros porque, las distintas isoformas de NOS, necesitan de la calmodulina, por lo tanto cada isoforma contiene dos monómeros de NOS y dos moléculas de calmodulina. Cada monómero contiene un dominio reductasa y otro dominio oxigenasa (Figura 3), los cuales por separado son catalíticamente activos, pero inactivos desde el punto de vista de generación de NO. El dominio oxigenasa (extremo N-terminal) contiene un Fe hemo, ZnS₄, cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄) y L-Arg. El dominio reductasa (extremo C-terminal) contienen flavín mononucleótido (FMN), flavín-adenín dinucleótido (FAD), y la unión específica para el NADPH (Aldreton *et al*, 2001).

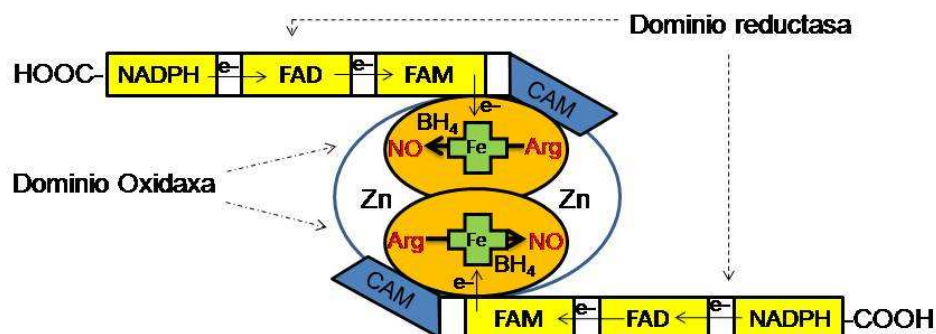


Figura 3: Esquema de la estructura de NOS y de la reacción catalítica de la formación del NO (Modificado de Münzel *et al*, 2005).

Los electrones donados por el NADPH en dominio reductasa de la enzima continúan con una cascada de reacciones redox hasta el dominio oxidasa, donde interactúan con el ion Fe y el cofactor BH₄, activando la catálisis de la L-Arg generando los productos citrulina y NO. Para que el electrón fluya dentro del dominio reductasa es necesaria la presencia del complejo Ca²⁺-Calmodulina (Alderton *et al*, 2001)

Las tres isoformas descritas son:

- **Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, NOS III)**, está presente en células endoteliales (Alderton *et al*, 2001), unida específicamente a la membrana. Su actividad es muy sensible a la concentración de Ca²⁺, que es considerado como el estímulo más importante de la actividad de la eNOS, pero existen otros mecanismos independientes de Ca²⁺ como: (1) procesos de fosforilación y desfosforilación de distintos aminoácidos (Govers y Rabelink, 2001), (2) sustancias vasoactivas dependientes de endotelio, como es el caso de la ACh y Bradikinina (BK), que se une a receptores de membrana acoplados a proteína G que activan el incremento de la disponibilidad de Ca²⁺ intracelular (Schulz *et al*, 1992), (3) fuerzas de cizallamiento, producidas por el flujo sanguíneo, que proporcionan también un incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ (Davies, 1995).
- **Óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS, NOS I)**, enzima citosólica completamente dependiente de Ca²⁺, presente principalmente en el sistema nervioso central y periférico (Alderton *et al*, 2001), cataliza la liberación de NO que desempeña el papel de neurotransmisor (Wiklund *et al*, 1997).
- **Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS II)**, enzima inducible independiente de Ca²⁺ (Alderton *et al*, 2001), aunque contiene un sitio de unión específico a la calmodulina. Realiza síntesis de novo por diversas citoquinas y endotoxinas mediante la activación de distintos factores nucleares, como el factor nuclear κ B (NF- κ B; Sheehan *et al*, 2002) a partir de concentraciones de Ca²⁺ inferiores a las requeridas por las otras dos isoformas (Hobbs *et al*, 1999). En situaciones patológicas, se induce la iNOS en los macrófagos y en las células endoteliales y musculares lisas, liberando, de estas, cantidades de NO mayores a las formadas por la eNOS y la nNOS (Fleming *et al*, 1991; Nava y Salazar, 1997).

2.2.- Mecanismos de acción

El NO liberado difunde fácilmente a las células cercanas, donde produce sus efectos fisiológicos mediante la activación de la sGC que produce guanosín 3',5'- monofosfato cíclico (cGMP) a partir del guanosín trifosfato (GTP; Hobbs *et al*, 1999). El cGMP, activa la proteína quinasa G (PKG), que mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina puede activar o inhibir la función de distintas proteínas que en conjunto llevan a la relajación de la célula muscular lisa, y por lo tanto, a una dilatación vascular (Ignarro y Kadowitz, 1985; Rivero-Vilches *et al*, 2003).

2.2.1.- Guanilato ciclasa soluble (sGC)

La sGC es una enzima heterodímera que contiene dos subunidades, α y β , de las cuales existen 4 tipos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) generadas por diferentes genes. Estructuralmente, las subunidades α y β , contienen un dominio C-terminal con actividad catalítica, una región de dimerización central (CDR), y un segmento N-terminal (NS) que contiene la porción hemo (Figura 4).

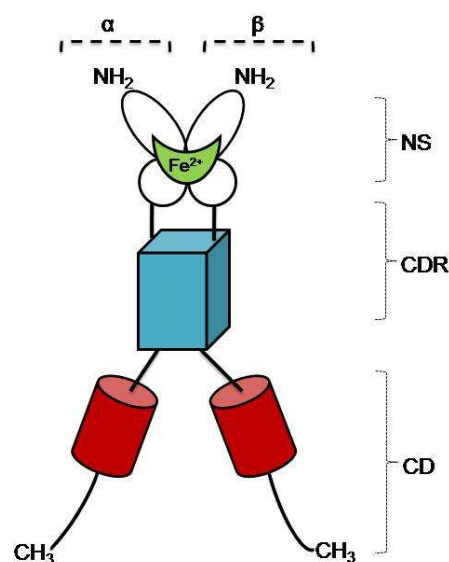


Figura 4: Representación esquemática de la estructura de la sGC. Ambas subunidades α y β contiene un dominio terminal ciclasa (CD), una región central de dimerización (CDR) y un segmento N-terminal (NS) con el grupo hemo (Fe^{2+}). (Modificado de Andreopoulos y Papapetropoulos, 2000)

La porción NS es la que confiere sensibilidad al NO. La unión covalente, de alta afinidad, del NO con el grupo hemo prostético induce un cambio conformacional de la enzima que tiene como resultado un incremento de la actividad catalítica. La oxidación del grupo hemo a su estado férrico da como resultado la pérdida de la actividad de la enzima (Ignarro *et al*, 1986). La actividad catalítica es propia de los extremos C-terminales de ambas subunidades, pero la actividad ciclasa de la enzima es dependiente de la coexpresión de ambas, por lo tanto, los dominios C-terminales, son los responsables de la conversión del GTP en cGMP, tras la previa activación con NO (Hobbs y col., 1999; Andreopoulos y Papapetropoulos, 2000).

Se ha descrito que una alteración en los niveles y/o actividad de la sGC puede jugar un importante papel en el desarrollo de distintas enfermedades vasculares, como hipertensión e hipoxia (Ruetten *et al*, 1999), por lo tanto, una correcta regulación de la expresión y/o actividad de la sGC, es crucial. Existen múltiples mecanismos reguladores, dependiendo del tipo de subunidad (1 ó 2) y tejido. Alguno de estos mecanismos son: (i) el propio NO es capaz de regular negativamente la expresión de las subunidades, con acciones sobre el mRNA (Filippov *et al*, 1997); (ii) el adenosín monofosfato cíclico (cAMP), que bien a través de su acción sobre la proteína quinasa A (PKA), puede fosforilar ambas isoformas de la sGC contribuyendo a su regulación, o bien, puede disminuir la actividad de la sGC a través de la reducción de los niveles de mRNA de las subunidades y de la proteína (Papapetropoulos *et al*, 1995); (iii) alteraciones mediante factores de crecimiento y modulaciones a través de citoquinas y lipopolisacáridos; y (iv) las especies reactivas de oxígeno (ver Apartado 3), que pueden provocar una estimulación de la sGC por el H₂O₂, o bien, una inhibición de la activación de la misma por los O₂⁻ (Wolin *et al*, 1998)

2.2.2.-Proteína quinasa G (PKG)

El producto de la activación de la sGC, el segundo mensajero cGMP, puede ejercer su función activando un amplio rango de proteínas, entre las que se encuentran quinasas y fosfatasa, siendo su mayor objetivo la PKG.

La PKG pertenece a la familia de serina/tronina quinasas, y en los mamíferos existen dos genes que regulan los 2 tipos existentes de PKG, prkg1 y prkg2 que codifican el tipo I y II, respectivamente (Wernet *et al*, 1989; Uhler, 1993).

En las células de músculo liso vascular se encuentra la PKG I, de las que existen 2 isoformas, PKG I α y PKG I β (Geiselhöringer *et al*, 2004). Todas las isoformas de la PKG forman una estructura proteica con arquitectura dimérica. Los distintos tipos de PKG (I α , I β , II) contienen tres dominios funcionales: un dominio amino-terminal; dominio regulador; y un dominio catalítico (Figura 5).

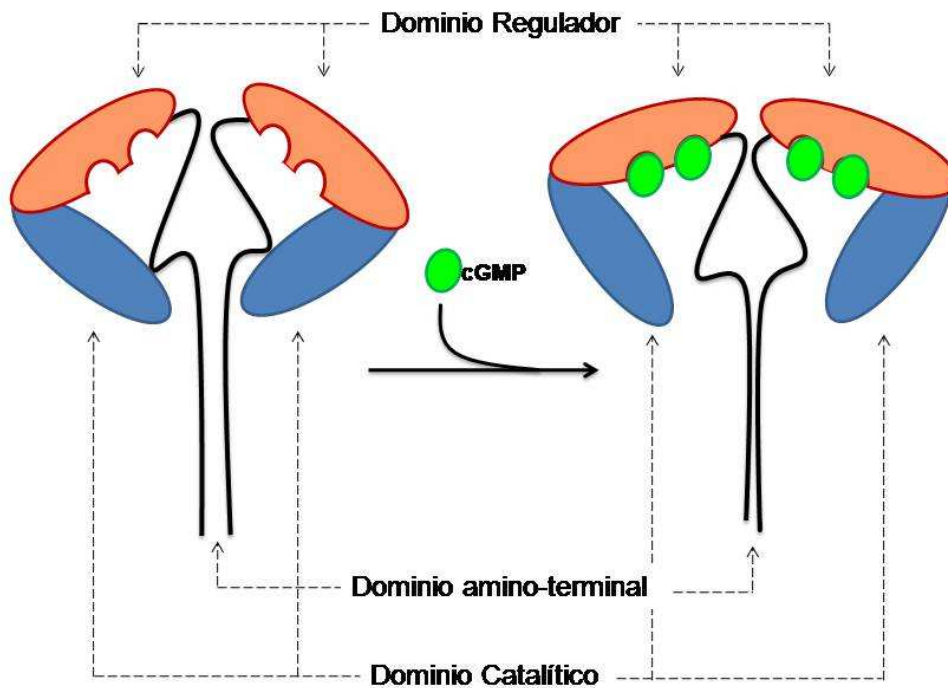


Figura 5: Representación esquemática del dímero de la PKG inactiva (izquierda) y la PKG activa (derecha) tras la unión de 4 moléculas de cGMP. (Modificado de Scholten *et al*, 2008).

El dominio N-terminal regula tres funciones diferentes, como son, la dimerización, la localización intracelular y la auto-inhibición. En el dominio regulador existen dos sitios de unión para dos moléculas de cGMP, en la PKG I α existe un sitio de alta afinidad y otro de baja afinidad, sin embargo, en la PKG I β los dos son de baja afinidad (Ruth *et al*, 1991; Ruth *et al*, 1997). La unión de las dos moléculas de cGMP, tanto en la PKG I α , como en la PKG I β , confiere un cambio conformacional de la enzima otorgándole su actividad catalítica (Heil *et al*, 1987). Pero el dominio N-terminal también confiere el estado inactivado de la PKG y de auto-inhibición. La auto-inhibición consiste en una regulación compleja de la PKG, aparte de la regulación de la misma por el cGMP, y consiste en una autofosforilación en varios residuos de serina en el dominio N-terminal (Pinkse *et al*, 2004). El papel fisiológico de la

autofosforilación de la PKG no está del todo claro, sin embargo, se ha descrito que la PKG autofosforilada presenta un incremento en la afinidad por cAMP (Smith *et al*, 1996). El dominio catalítico es el extremo C-terminal y confiere el sitio de unión de ATP/Mg²⁺ y del sustrato, el cual fosforila la enzima activada.

2.2.3.- Vía NO/cGMP/PKG

Existen tres mecanismos regulados por la vía de señalización NO/cGMP/PKG que inducen relajación en las células de músculo liso vascular (Lincoln *et al*, 2001), estos son (Figura 6):

· *Disminución de la concentración de Ca²⁺ libre intracelular*

El Ca²⁺ es un requisito indispensable para la fosforilación de la cadena ligera de miosina y por consiguiente de la contracción celular, por lo tanto la disminución de los niveles de Ca²⁺ libre intracelular es el primer mecanismo de inhibición de la contracción.

La PKG puede actuar como inhibidor de canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática o de la proteína PLC, que reduce la concentración de Ca²⁺ intracelular; o puede por el contrario, activar la Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática (Vrolix *et al*, 1988) y del retículo sarcoplasmático (Cohen *et al*, 1999), liberando Ca²⁺ al exterior de la célula e introduciéndolo al interior del retículo sarcoplasmático, respectivamente. La PKG puede también fosforilar al receptor del IP3 del retículo sarcoplasmático, introduciendo Ca²⁺ en el retículo (Schlossmann *et al*, 2000).

Es importante citar a los canales de potasio dependientes de Ca²⁺ (que se explicarán detenidamente más adelante, Apartado 4), los cuales se activan por un incremento de Ca²⁺ intracelular, provocando una hiperpolarización de la membrana celular y una reducción en el flujo de Ca²⁺ hacia el interior celular a través de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. La activación de estos canales puede estar incrementada por la acción de la PKG, tanto directa (Hampl *et al*, 1995) como indirectamente: (1) se ha descrito que la PKG regula la fosforilación de los canales de potasio dependientes de Ca²⁺, produciendo directamente la fosforilación (Fukao *et al*, 1999), o activando a una enzima fosfatasa que desfosforila al canal (Zhou *et al*, 1996), estos resultados insinúan la existencia de canales de potasio dependientes de Ca²⁺ específicos en distintos tipos celulares y tejidos (Lincoln *et al*, 2001); o que (2) la PKG activa

las corrientes transitorias y espontáneas hacia el exterior de Ca^{2+} (*spontaneous transient outward current*, STOC), liberando de la superficie sarcoplasmática del retículo pequeñas cantidades de Ca^{2+} al espacio subplasmático que activan únicamente al canal de potasio plasmático (Porter *et al*, 1998).

· *Disminución de la activación del mecanismo de la contracción*

En el proceso de contracción, es necesario que se produzca una fosforilación en la cadena ligera de miosina (MLC), para este proceso están implicadas la MLCK (una quinasa activada por el complejo Ca^{2+} -Calmodulina), que es la responsable de fosforilar la MLC y una MLC fosfatasa (proteína serina/ treonina fosfatasa tipo I) que tiene que estar inhibida. Cuando cesa la contracción, este proceso se invierte, la MLCK se inhibe y la MLC fosfatasa se activa.

En relación a la regulación de la MLCK, no hay evidencias firmes que demuestren que la fosforilación dependiente de la PKG inhiba su actividad (Van Riper *et al*, 1997), sin embargo, si existen trabajos que sugieren que la PKG activa la MLC fosfatasa, inhibiendo la fosforilación de la MLC y la contracción (Huang *et al*, 2004).

· *Regulación de los filamentos finos*

Los filamentos finos contienen proteínas que regulan y contribuyen en la actividad contráctil de la célula, se han propuesto dos (VASP: *vasodilatory-stimulated phosphoprotein* y HSP20: *20 kDa heat shock-related protein*) y existen evidencias que consideran un posible papel de los segundos mensajeros en la regulación de la función de estas proteínas de los filamentos finos.

Las VASP están presentes en casi todos los tipos celulares estudiados, localizadas en los focos de adhesión, y tanto PKA como la PKG catalizan la fosforilación de las VASP, se ha descrito cómo la fosforilación de las VASP por la PKG provoca una disminución de los sitios de unión entre las VASP y los filamentos de actina, probablemente por una disociación de las proteínas de los filamentos de actina disminuyendo la vasoconstricción (Reinhard *et al*, 1995).

Se ha descrito que las HSP20 también pueden ser fosforiladas por PKA y PKG y mediar relajación a través de su interacción con los filamentos finos (Beall *et al*, 1999; Brophy *et al*, 1999).

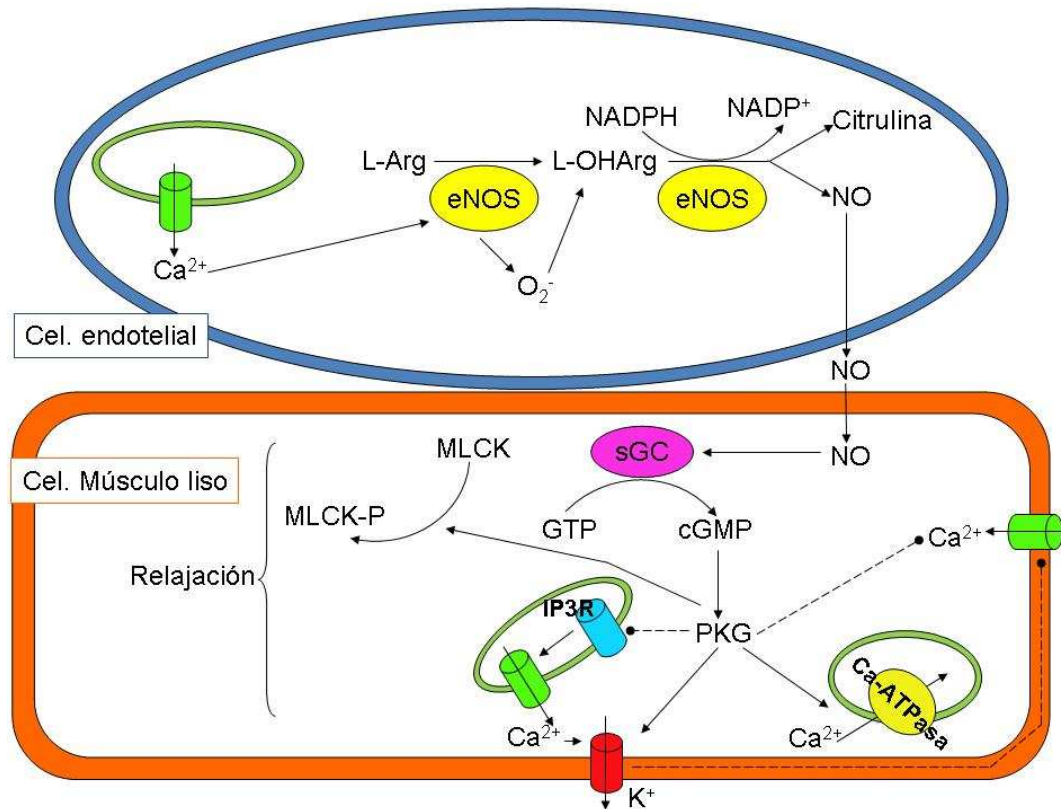


Figura 6. Biosíntesis del NO a partir de la L-arginina (L-Arg) en las células endoteliales. La entrada de Ca^{2+} activa la eNOS que incorpora O_2 para formar NO y L-citrulina, a través de un compuesto intermedio, N^G-Hidroxi-L-Arginina (L-OHArg). La oxidación de L-OHArg a L-citrulina requiere NADPH y BH_4 . En las células musculares lisas el NO, que difunde libremente de las células endoteliales, activa la guanilato ciclasa soluble (sGC) incrementando los niveles de cGMP a partir de GTP. El cGMP activa la proteína quinasa dependiente de cGMP, la PKG, que produce relajación por varios mecanismos entre los cuales está la inhibición de la entrada de Ca^{2+} ; estimulación de la entrada de Ca^{2+} , por la Ca^{2+} -ATPasa, al retículo sarcoplasmático; la fosforilación de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK); o la activación de canales de K^+ , directamente o estimulando la liberación de pequeñas cantidades Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático que ejerzan su activación. Los canales de K^+ inhiben a los canales de Ca^{2+} de membrana.

3.- ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) está asociada con el metabolismo normal de las células (Wolin, 2000; Wolin *et al*, 2002; Rutkowski *et al*, 2007) y cumplen una importante función en varios procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción. La destrucción de microorganismos por fagocitosis, la síntesis de mediadores inflamatorios y la detoxificación constituyen algunos ejemplos relevantes (Meier, 2001). Las ROS influyen en la fisiología y proliferación de los distintos tipos de células (Yasuda *et al*, 1999; Abid *et al*, 2000). Bajos niveles de ROS son beneficiosos y estimulan el crecimiento celular; por el contrario, se ha demostrado que altos niveles de ROS son tóxicos, ya que al oxidar moléculas biológicas desencadenan trastornos en el metabolismo celular, induciendo a la apoptosis y necrosis celular (Luczak *et al*, 2004). En el sistema cardiovascular las ROS juegan un papel fisiológico esencial, manteniendo la integridad cardíaca y vascular y participando en la regulación del tono vascular (Ellis y Triggle, 2003). En situación de hipertensión, diabetes, aterosclerosis, daño por isquemia-reperfusión, etc. (Landmesser y Harrison 2001; Zalba *et al*, 2001), las ROS pueden modular el tono y la estructura del vaso sanguíneo, estimulando el crecimiento de las células de músculo liso vascular, la migración celular, la inflamación y el depósito de proteínas de la matriz celular, lo que provoca un proceso de remodelado vascular, que incluye disfunción endotelial y engrosamiento de la pared vascular (Figura 7; Touyz y Schiffrin, 2004).

En condiciones normales, existe un equilibrio entre la formación y eliminación de ROS, permitiendo la cantidad necesaria que asegura la homeostasis vascular.

Se conoce como **estrés oxidativo** a *“la resultante de una excesiva exposición a agentes generadores de radicales libres o a una deficiencia de sustancias protectoras naturales”* (Miller *et al*, 1993) y ha sido identificado como un factor patogénico en enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, la diabetes, la hipercolesterolemia y la aterosclerosis (Cai *et al*, 2000; Rueckshloss *et al*, 2003).

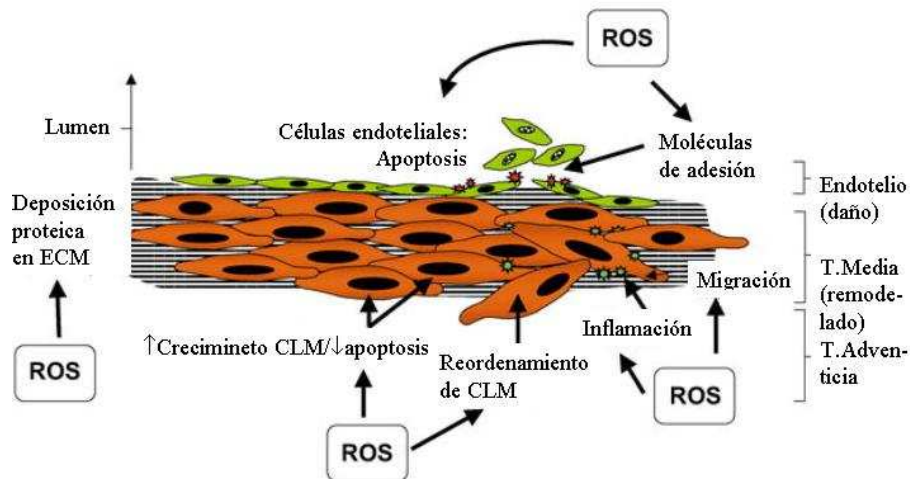
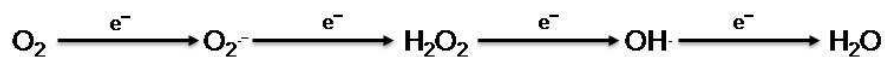


Figura 7: Efecto vascular de las especies reactivas de oxígeno (ROS). El incremento de ROS participa en el crecimiento de la célula muscular lisas (CLM), la inflamación, la migración y la deposición proteica en la matriz extracelular (ECM) (Touyz y Schiffrini, 2004).

3.1.- Síntesis

Las ROS se generan como productos intermedios en reacciones de oxidación-reducción, que transforma el O_2 en H_2O . La reducción del O_2 por un electrón (e^-) genera el anión superóxido (O_2^-), reducciones consecutivas generan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Fridovich, 1997; Touyz y Schiffrin, 2004):



• **Anión superóxido** (O_2^-), es soluble en agua, puede actuar como agente oxidante, reduciéndose a H_2O_2 , o como agente reductor, donando un electrón para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) con el NO (Fridovich 1997).

La producción de O_2^- en el sistema cardiovascular se debe en gran medida a la enzima NAD(P)H oxidasa, presente en el endotelio, músculo liso y adventicia (Mohazzab-H *et al*, 1994^a; Touyz y Schiffrin 2004). Es una enzima compuesta por cinco subunidades ensambladas en la membrana celular que cataliza la producción de O_2^- por la reducción del O_2 , utilizando NAD(P)H como donador de electrones (Figura 8) (Wolin *et al*, 2002; Ray y Shah, 2005).



Las oxidasas endoteliales están continuamente generando pequeñas cantidades de O_2^- , en células no estimuladas; sin embargo, esta actividad puede verse aumentada por agonistas específicos como la angiotensina II (AII), endotelina 1 (ET-1) o ACh (Ray y Shah, 2005). El mecanismo, “*en ausencia de estímulo*”, que controla la actividad de estas enzimas depende de la disponibilidad de NAD(P)H citosólico (Wolin *et al*, 1999; Gupte *et al*, 1999). El índice de producción de O_2^- por las NAD(P)H oxidasas vasculares, parece ser dependiente de la concentración de O_2 , lo que permite a la oxidasa funcionar como un sensor fisiológico de la presión de O_2 (Wolin *et al*, 1999; Mohazzab-H^b y Wolin, 1994).

Los estímulos que pueden incrementar la actividad de este complejo incluyen factores humorales como citoquinas (TNF α , IL-1), factores de crecimiento (TGF β , trombina, VEGF, PDGF), agentes vasoactivos (agonistas de receptores acoplados a proteínas G como AII y ET-1), y factores físicos como el *shear stress* (estrés por estiramiento) (Lassegue y Clempus, 2003; Touyz y Schiffrin, 2004; Wassmann *et al*, 2004; Ray y Shah, 2005).

También existen otras enzimas capaces de generar O_2^- como la citocromo P-450 reductasa, la xantina oxidasa, la óxidorreductasa de la respiración mitocondrial cuya contribución en la generación vascular de ROS es relativamente menor comparado con la NAD(P)H oxidasa (Touyz y Schiffrin, 2004). También las tres isoformas de NOS son capaces de producir O_2^- en condiciones de déficit de sustrato (arginina) o de cofactor BH₄ (Pou *et al*, 1995; Wever *et al*, 1998). Esta situación es conocida como “*el desacoplamiento de la NOS*” y está presente en distintas enfermedades cardiovasculares como son la hipertensión, diabetes, arterosclerosis o hiperhomocisteinemia (Touyz y Schiffrin, 2004).

Como se ha citado anteriormente el O_2^- puede reaccionar con NO produciéndose una reacción químicamente espontánea e irreversible (Wolin, 2000) (Figura 8):



El producto de la reacción, el ONOO⁻, es un potente oxidante con importantes efectos biológicos (Münzel *et al*, 1997): (1) produce la nitración de la tirosina, en proteínas como prostaciclina sintasa y superóxido dismutasa dependiente

Mn (MnSOD); (2) produce la activación de polimerasas y expresión de iNOS, importante mediador de la disfunción endotelial; (3) oxidación de BH₄; (4) oxidación del complejo tiolato de eNOS, lo cual desencadena su desacoplamiento (Faraci y Didion, 2004) y (5) ejerce un papel vasodilatador como se ha descrito en arteria mesentérica de rata (Martín *et al*, 2005) y en arteria coronaria canina y bovina (Liu *et al*, 1994; Iesaki *et al*, 1999).

•Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂). No es un radical libre sino una molécula mucho más estable y permeable a las membranas biológicas en comparación con otras ROS. Es una molécula de señalización y regulación de la expresión génica y puede llegar a ser un importante mediador de hipertrofia en el músculo liso vascular. También puede activar factores transcripcionales y ejercen un papel semejante al factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) en algunos vasos sanguíneos (Faraci y Didion, 2004), es más, se ha descrito que parece ser el EDHF en la arteria mesentérica humana y de ratón (Motoba *et al*, 2000; Motoba *et al*, 2002) y en los microvasos coronarios porcinos, caninos y humanos (Motoba *et al*, 2003; Miura *et al*, 2003; Yada *et al*, 2003). Se produce gracias a una reducción de O₂⁻ llevada a cabo por la metaloenzima superóxido dismutasa (SOD; Fridovich, 1997) (Figura 8).



En los sistemas biológicos las concentraciones locales de H₂O₂ están reguladas por la acción de otras enzimas como la catalasa o la glutatión peroxidasa (Schafer y Beutner, 2001).

A nivel vascular, el H₂O₂ produce relajación directa de las células de músculo liso vascular, como se ha descrito en arterias pulmonares y coronarias bovinas (Cherry *et al*, 1990; Iesaki *et al*, 1999) y en arterias cerebrales de gato (Fraile *et al*, 1994), así mismo, tiene un efecto hiperpolarizante en arterias cerebrales de rata (Sobey *et al*, 1997) y en arterias coronarias porcinas (Barlow y White, 1998). Sin embargo, se le ha atribuido un papel vasoconstrictor en aorta de rata (Sotniková, 1998; Rodríguez-Martínez *et al*, 1998). También participa en la regulación de la migración y proliferación de células de músculo liso vascular a través de la activación de distintas proteínas quinasa como son la proteína

quinasa B (PKB) y la quinasa que regula la señal extracelular (ERK) (Mehedi *et al*, 2007).

•**Radical hidroxilo (OH^\cdot)**. Se produce con la reducción del H_2O_2 en presencia de moléculas que contengan metales como el Fe^{2+} (Fridovich, 1997). Es extremadamente reactivo e induce daño local donde es formado. Se ha postulado que el OH^\cdot puede dañar el retículo sarcoplasmático en las células de músculo liso, reduciendo la liberación de Ca^{2+} del mismo (Sasaki y Okabe, 1993)

Los OH^\cdot causan contracción dependiente de endotelio a través de una activación de la síntesis de prostanoïdes vasoconstrictores como el tromboxano A_2 (TXA_2) en el músculo liso vascular (Auch-Schwelk *et al*, 1989; Hibino *et al*, 1999).

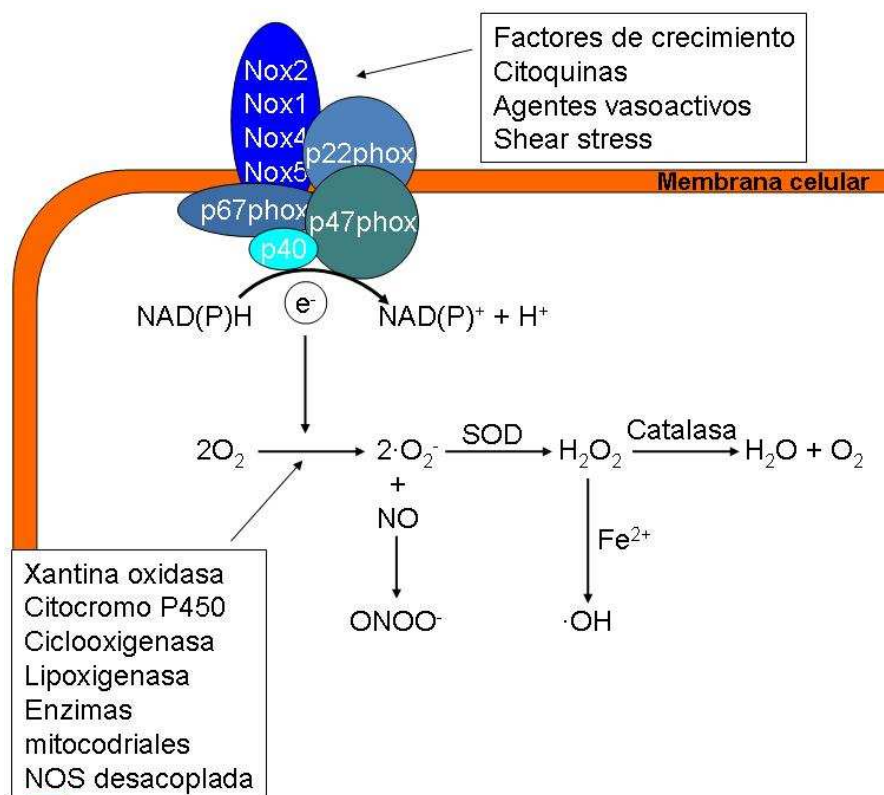


Figura 8: Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células vasculares. Muchos sistemas enzimáticos, incluidos la NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa, NOS, etc., están involucrados en la generación de ROS. Los aniones superóxido actúan como oxidante, reduciéndose a H_2O_2 por la acción de la superóxido dismutasa (SOD), o como reductor, donando un electrón (e^-) para formar ONOO^- con el NO. El H_2O_2 es reducido por la catalasa a H_2O , pero puede también reducirse para generar OH^\cdot en presencia de Fe^{2+} (Modificado de Touyz y Schiffrin 2004)

3.2.- Antioxidantes

Los antioxidantes biológicos son moléculas naturales que previenen la formación incontrolada de radicales libres y ROS, y/o activan su eliminación, evitando las reacciones de éstos con distintas estructuras biológicas. Existen antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos. Estos últimos son esenciales en la protección de componentes celulares al daño que producen muchas de las especies de ROS, pero esta protección no cubre todos los casos, como por ejemplo la reducción de los O_2^- o el H_2O_2 ; de ahí que la propia naturaleza haya diseñado enzimas antioxidantes específicas (Chaudiere y Ferrari-Iliou, 1999).

3.2.1.-Superóxido dismutasa (SOD).

Entre todos los mecanismos enzimáticos, SOD es la primera y única línea de defensa ante la producción O_2^- (Kinnula y Crapo, 2003). La SOD es una dismutasa que cataliza la dismutación de dos e^- de dos O_2^- a la formación de una molécula de H_2O_2 y O_2 (Chaudiere y Ferrari-Iliou, 1999):



Existen varias consecuencias funcionales a la actividad de esta enzima (Faraci y Didion, 2004):

- (1) en primer lugar protegen de la citotoxicidad provocada por los O_2^- ,
- (2) evitan la reacción de los O_2^- con el NO para dar lugar a $ONOO^-$. Los O_2^- reaccionan con el NO más eficazmente que con cualquier otra molécula, y por tanto la concentración local de SOD es la clave determinante de la biodisponibilidad del NO, proporcionando a la SOD la función de proteger al NO y los consecuentes efectos mediados por el mismo.
- (3) provocan la formación de H_2O_2 , que es relativamente más estable.

Se han identificado tres isoformas de SOD (Fukai *et al*, 2000): Cu/ZnSOD (o SOD 1), la cual contiene cobre y zinc y es citosólica; MnSOD (o SOD 2), que contiene manganeso y es mitocondrial; y ecSOD (o SOD 3), que también contiene Cu/Zn, pero es extracelular. Cada una de ellas está codificada por diferentes genes, pero todas catalizan la misma reacción (Faraci y Didion, 2004).

- **Cu/ZnSOD;** estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia de la Cu/ZnSOD en el sistema vascular. Una deficiencia en la actividad de la misma, supone un incremento de los niveles vasculares de O_2^- y $ONOO^-$, incremento del tono miogénico, y aumento de la respuesta vasoconstrictora (Didion *et al*, 2002). También se ha descrito que alteraciones de la expresión de la SOD puede afectar a la estructura vascular (Baumbach *et al*, 2003). Además, se ha descrito que en algunos modelos de hipertensión la expresión y/o actividad de la Cu/ZnSOD está incrementada. Trabajos con ratones transgénicos que presentan una sobreexpresión de Cu/ZnSOD demuestran una prevención efectiva al incremento de los O_2^- y atenuación al incremento de la presión arterial en respuesta a AII (Wang *et al*, 2002).
- **MnSOD;** la MnSOD es considerada la primera línea de defensa sobre el estrés oxidativo debido a que la cadena transportadora de electrones mitocondrial convierte un 5% de O_2 en O_2^- . La expresión o la actividad vascular de la MnSOD puede variar bajo muchas y diversas condiciones fisiopatológicas. Así, por ejemplo, la expresión de la MnSOD está incrementada en la pared de los vasos de animales crónicamente hipertensos (Uddin *et al*, 2003), o bien, la actividad se ve disminuida a causa de la nitración provocada por el $ONOO^-$ en otras condiciones patológicas que incluyen la diabetes, aterosclerosis, inflamación, envejecimiento.
- **ecSOD;** la ecSOD es la única isoforma de SOD que se expresa en el medio extracelular, en la membrana basal y en la propia matriz extracelular. La expresión de ecSOD en la vasculatura puede verse alterada en respuesta a multitud de estímulos como son el ejercicio, factores de crecimiento, citoquinas, sustancias vasoactivas (AII, NO...), etc., (Faraci y Didion, 2004). Se ha hipotetizando que la principal función de la ecSOD es proteger al NO en su difusión desde el endotelio hasta el músculo liso donde actuará sobre la sGC (Oury *et al*, 1996; Ookawara *et al*, 2003).

Es importante recalcar, que existen diferencias entre especies de la cantidad vascular de ecSOD, mientras que en ratón y humano los niveles de ecSOD vasculares son similares, en rata son mucho menores y esto parece ser debido a una diferencia fenotípica que afecta a la subunidad proteica de interacción (Marklud, 2002).

Se ha descrito en aorta de ratón que la actividad total de la SOD, aproximadamente del 50%-80%, es realizada por la Cu/ZnSOD, entre 2% -12% por la MnSOD y el resto por la ecSOD y se ha observado un patrón parecido en la expresión en arterias humanas (Faraci y Didion, 2004).

3.2.2.- Catalasa

La catalasa es una hemoproteína intracelular, localizada mayoritariamente en los peroxisomas, aunque también existe en el citosol. El H_2O_2 producido al actuar la SOD, que tiene carácter tóxico a nivel celular, se transforma, mediante la transferencia de dos e^- , a una molécula de H_2O y O_2 (Schonbaum y Chance, 1976; Chaudiere y Ferrari-Iliou, 1999).



Pero la catalasa tiene también actividad peroxidasa y reacciona con peróxidos orgánicos y donadores de hidrógeno formando agua y alcoholes (Wassmann *et al*, 2004).

3.2.3.- Glutation peroxidasa

La glutatión peroxidasa es una enzima antioxidante que contiene selenio, reduce el H_2O_2 y peróxidos lipídicos a agua y alcoholes lipídicos respectivamente. Por esto juega un papel importante en la regulación del estado redox de la célula de músculo liso vascular.

Las actividades asociadas de estos sistemas antioxidantes protegen de la oxidación, no sólo eliminado directamente del medio los O_2^- y H_2O_2 , sino impidiendo la formación de OH^- (Wassmann *et al*, 2004).

4.- CANALES DE POTASIO

Los canales de potasio (K^+) son complejos proteicos de membrana implicados en la regulación de distintas funciones celulares. Se ha descrito la existencia de canales de K^+ en las células endoteliales y en las células de músculo liso vascular.

La función de los canales de K^+ es la de mantener un determinado potencial de membrana, participando así en la regulación del tono vascular. Vasodilatadores derivados del endotelio (NO, PGI_2 , EDHF) pueden activar (abrir) los canales de K^+ , permitiendo el flujo de iones K^+ hacia el exterior celular, creando una disminución del potencial de membrana (hiperpolarización). A consecuencia de esta hiperpolarización se cierran los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, disminuyendo la concentración de Ca^{2+} intracelular y produciéndose relajación en las células de músculo liso vascular. La inhibición de los canales de K^+ disminuye la salida de K^+ y abre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, incrementando el potencial de membrana (despolarización) produciéndose vasoconstricción. Son muchas las sustancias vasoactivas que participan en la regulación de los canales de K^+ , como las ROS, NO, AII, derivados del ácido araquidónico, etc. (Ellis y Triggle, 2003; Shimokawa y Motoba, 2004).

Se ha asociado la disfunción de los canales de K^+ con patologías como la hipertensión, diabetes, aterosclerosis y *shock* séptico (Baranowska *et al*, 2007). Se han identificado varios tipos de canales de potasio en las células de músculo liso vascular y endoteliales: canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (de larga-, intermedia- y pequeña-conductancia); canales de K^+ dependientes de ATP; canales de K^+ dependiente de voltaje (de larga-, intermedia- y pequeña-conductancia); y canales de K^+ *inward-rectifying* (rectificadores internos).

4.1.- Canales de potasio dependientes de Ca^{2+} (BK_{Ca} , IK_{Ca} , SK_{Ca})

Los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}) se dividen en tres grupos según sus rangos de conductancia: (1) de larga conductancia, BK_{Ca} (200-250pS); (2) conductancia intermedia, IK_{Ca} (20-40 pS) y (3) pequeña conductancia, SK_{Ca} (5-10 pS). Los tres tipos son sensibles al Ca^{2+} pero con distinta afinidad y cada uno presenta propiedades moleculares, biofísicas y farmacológicas propias,

además están codificados por distintos genes (Jersen *et al*, 2001; Atkinson *et al*, 1991).

Los canales K_{Ca} están expresados en muchos tipos celulares, donde juegan un papel esencial en la regulación de varias funciones celulares. Los canales BK_{Ca} , junto con los IK_{Ca} y los SK_{Ca} , se expresan en las células endoteliales, sin embargo en las células musculares lisas sólo se expresan los IK_{Ca} (en situación proliferativa) y los canales BK_{Ca} . En particular, los canales BK_{Ca} están muy estudiados en las células de músculo liso vascular, porque contribuyen al control del tono vascular (Eichhorn y Dobrev, 2007).

Estructuralmente, los canales BK_{Ca} son un tetrámero de subunidades α que forman un poro y cuatro subunidades β adicionales que pueden modificar las propiedades básicas del canal. Cada subunidad α está compuesta por 11 dominios hidrofóbicos, 7 de ellos son transmembrana (S0-S7) y 4 son citoplasmáticos (S8-S10). La subunidad α presenta alta sensibilidad a la concentración de Ca^{2+} intracelular en su región citoplasmática, pero también tiene un sensor al voltaje de la membrana en el dominio S4 debido a que este segmento contiene aminoácidos cargados positivamente (Korovkina y England, 2002). La subunidad β está formada por 2 dominios transmembrana (S1 y S2), existen 4 isoformas. La isoforma β_1 es la predominante en las células de músculo liso vascular (Jiang *et al*, 1999) y su principal función es incrementar la sensibilidad del canal al Ca^{2+} (Nimigeen y Magleby, 1999) (Figura 9).

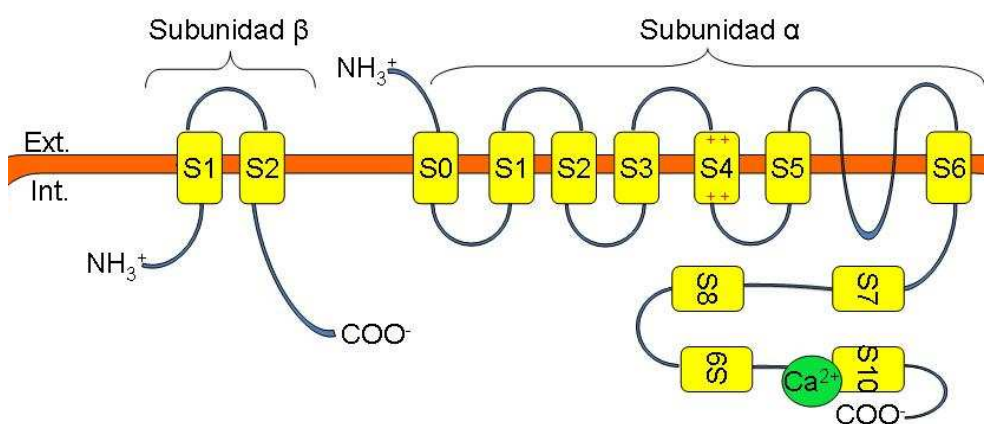


Figura 9: Representación esquemática de una subunidad α y una subunidad β del canal BK_{Ca} .

La función de los canales BK_{Ca} en las células de músculo liso vascular está regulada por diversidad de factores vasodilatadores y vasoconstrictores. Por ejemplo, los canales BK_{Ca} pueden activarse directamente por el NO derivado del endotelio (Bolotina *et al*, 1994) o por cGMP (Fukao *et al*, 1999); la cascada de reacción que produce el cGMP, produce que la PKG fosforile el canal en la ser-1072, dando como resultado su activación (Calderone, 2002); sin embargo, se ha descrito que la actividad de los canales BK_{Ca} también puede estar regulada por los niveles de cAMP y por su consecuente acción sobre la PKG, no sobre la PKA, pues se ha descrito, en arterias pulmonares y coronarias, que al estimular con forskolina (activador de la adenilato ciclasa y PKA) ó CPT-cAMP (derivado de cAMP permeable) en células de músculo liso vascular, se produce la activación de los canales BK_{Ca} y esta activación es inhibida al incubarse con el inhibidor específico de la PKG, sin embargo, no se ve modificada al bloquear la actividad de la PKA (Barman *et al*, 2003; White *et al*, 2000^a).

Otros factores como la AII y la ET-1 pueden inhibir la actividad del canal BK_{Ca} a través de la activación de la PKC (Barman *et al*, 2004^a), sin embargo, también se ha descrito que elementos de la cascada de señalización de la AII pueden activar estos canales (Ling *et al*, 2000); esto sugiere una compleja regulación de los canales BK_{Ca} .

En las células endoteliales el cGMP está involucrado en la activación de los canales BK_{Ca} , pero no requiere a la PKG, lo cual indica que existen distintos mecanismos dependientes de cGMP para la activación de los canales BK_{Ca} entre las células endoteliales y del músculo liso (Eichhorn y Dobrev, 2007).

En ambos tipos celulares, los ROS inducen la inhibición del canal por medio de los $ONOO^-$. Sin embargo, se ha descrito que el H_2O_2 puede activar el canal (1) directamente por modificaciones moleculares (Hayabuchi *et al*, 1998); (2) a través de un incremento de Ca^{2+} intracelular (Roveri *et al*, 1992); (3) a través del metabolismo del ácido araquidónico (AA) (Barlow y White, 1998); por el contrario, puede inhibirlo, evitando su actividad fisiológica. El efecto del H_2O_2 sobre los canales BK_{Ca} es complejo y depende a las condiciones experimentales utilizadas o al tipo celular analizado (Gutterman *et al*, 2005). En este sentido, en machos se ha descrito que los O_2^- en ausencia de hormonas sexuales ejercen un papel vasodilatador a través de la activación de los

canales BK_{Ca} (Ferrer *et al*, 1999), poniendo de manifiesto la existencia de una regulación hormonal sobre la actividad del canal.

Enfermedades como la hipertensión, la aterosclerosis y la diabetes están asociadas con alteraciones en el funcionamiento del de los canales BK_{Ca} . En el caso de la hipertensión, la actividad del canal esta incrementada, como la amplitud de corriente, elevando el potencial de membrana y por consecuente el tono vascular, en aterosclerosis el incremento de la actividad de los canales BK_{Ca} en las células endoteliales y musculares es consecuencia de un mecanismo compensatorio y sin embargo en diabetes se disminuye su actividad a causa de una disminución en la sensibilidad al Ca^{2+} por una menor expresión de la subunidad β (Eichhorn y Dobrev, 2007).

4.2- Canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP})

Los canales de K_{ATP} están ampliamente distribuidos en multitud tejidos, incluidos el corazón y la vasculatura, participando con un papel esencial en la regulación del sistema cardiovascular (Kurachi, 1998).

Cambios en la concentración intracelular de ATP y adenosín difosfato (ADP) u otros nucleótidos determinan la actividad del canal (Babenko *et al*, 1998)

Estructuralmente, está formado por un hetero-octámero que contiene dos tipos diferentes de subunidades; cuatro subunidades Kir que forman el poro del canal y cuatro subunidad SUR.

La subunidad Kir está codificada por unos genes de la familia de *Kir*, genes rectificadores internos (*inward rectifier*) que se definen por ofrecer una fuerte conductancia, tanto hacia dentro, como hacia fuera obteniendo el potencial de membrana. Se han identificado 7 subfamilias Kir (1.X-7.X), pero los canales K_{ATP} pertenecen a la subfamilia Kir6.X (Kubo *et al*, 2005) de la que se han descrito dos isoformas: Kir6.1 y Kir6.2, ambas presentes en la vasculatura (Gao *et al*, 2005; Miki y Seino, 2005). La subunidad Kir6.X está formada por dos segmentos transmembrana (M1, M2) entre los cuales se encuentra la región-poro, los extremos N- y C-terminal se encuentran en el citoplasma.

La diversidad molecular que existe entre especies y tejidos en los canales K_{ATP} es provocada por la variedad de isoformas de la subunidad SUR (SUR1, SUR2A y SUR2B), en el músculo vascular se ha descrito la subunidad SUR2B

(Gribble y Reimann, 2002). La subunidad SUR es un receptor de sulfonilureas (drogas antidiabéticas) que pertenece a la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*) (Higgins, 1995; Demolombe y Escande, 1996; Jones y George, 1999). Estructuralmente, cada subunidad SUR, está formada por 17 segmentos transmembrana, agrupados en tres grupos o dominios: TMD0 (5 segmentos), TMD1 y TMD2 (6 segmentos cada uno) (Tusnády *et al*, 1997) (Figura 10).

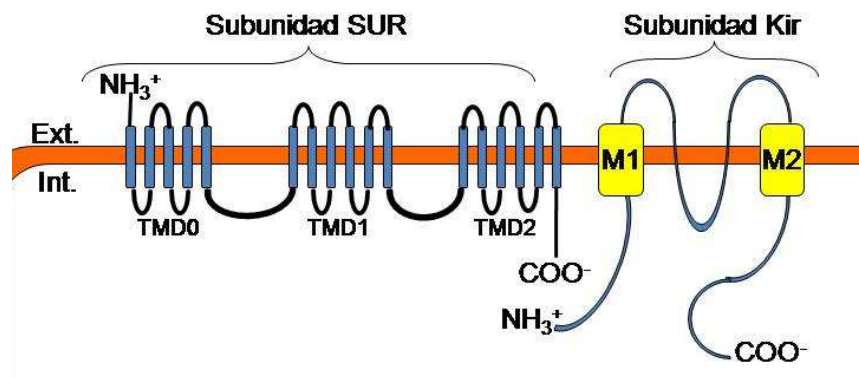


Figura 10: Representación esquemática de la estructura de la subunidad Kir y SUR del canal K_{ATP} .

También se han descritos estos canales en las células endoteliales, donde son responsables de mantener el potencial de membrana y de la liberación de compuestos vasoactivos. Así, en cultivos celulares endoteliales, la activación de estos canales provoca un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y en la liberación de NO (Wang *et al*, 2007). Se han identificado sitios específicos de fosforilación provocados por las enzimas PKC y PKA en la subunidad Kir6.X modulando la actividad del canal, por ejemplo, se ha descrito que los derivados del AA, los ácidos epoxyeicosatrienoicos (Lu *et al*, 2006), la prostaciclina (PGI_2) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Mannhold, 2004) a través de la PKA activan los canales K_{ATP} , así mismo también se ha descrito la participación de la PKA sobre la subunidad SUR2B dando también actividad al canal (Shi *et al*, 2008). Sin embargo, vasoconstrictores como serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y vasopresina inhiben el canal a través de la PKC (Mannhold, 2004). Al igual que con los canales K_{Ca} , en los canales K_{ATP} también participan las ROS en su regulación. Así, se ha descrito que el H_2O_2 puede interaccionar con la subunidad SUR, provocando una disminución

en la afinidad de esta por el ATP (Ichinari *et al*, 1996) o puede directamente reducir las concentraciones citosólicas de ATP (Hyslop *et al*, 1988), lo que lleva a la activación del canal, también se ha descrito que los O_2^- inhiben al canal por sus acción sobre la PKC (Kinoshita *et al*, 2004) o por el contrario la formación de un factor relajante de naturaleza desconocida que abre los canales K_{ATP} (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995).

4.3.- Canales de potasio dependientes de voltaje (K_v)

Se ha descrito que estos canales están presentes extensamente en las células endoteliales y de músculo liso vascular (Korovkina y England, 2002).

Los canales K_v se activan en respuesta a una despolarización de la membrana dando como resultado una repolarización y volviendo al potencial de reposo celular. La despolarización de la membrana activa la entrada de Ca^{2+} y la consiguiente activación de la maquinaria de contracción. Por lo tanto, tomando estos dos mecanismos juntos, la función de los canales K_v es limitar la despolarización de la membrana y mantener el tono vascular (Korovkina y England, 2002; Ko *et al*, 2008).

Estructuralmente los canales de K_v están formados por tetrámero de 4 subunidades α , cada subunidades α está compuesta por 6 dominios transmembrana (S1-S6) con un N- y C-terminal citoplasmático, el dominio S4 es sensible al voltaje (similar al dominio S4 de los canales BK_{Ca}) y asociada a una subunidad β auxiliar citoplasmática (Figura 11).

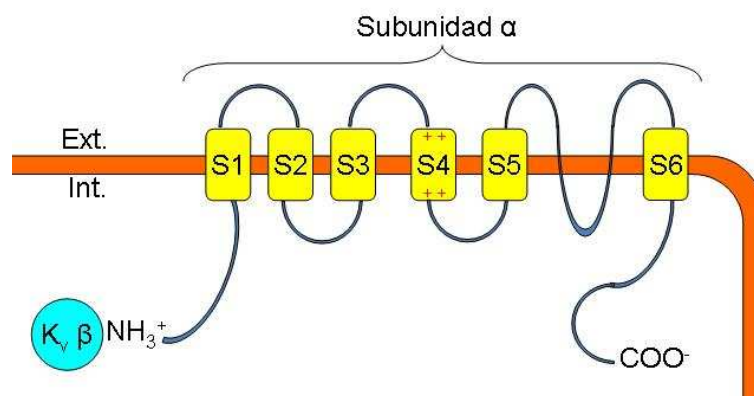


Figura 11: Representación esquemática de la estructura de una subunidad α del canal K_v

Hasta ahora se han identificado 30 genes capaces de codificar las distintas subfamilias de subunidades α de los canales K_v (Levitan y Takimoto, 1998) y la regulación de la expresión de estos genes depende de varios factores, como regulación hormonal, factores transcripcionales, etc. Al igual que los canales BK_{Ca} , se ha visto que los canales K_v pueden ensamblarse como un homo- o hetero-tetrámero, y dependiendo de la subunidad β auxiliar a la que se une el canal K_v puede seguir distintos caminos funcionales. La subunidad β puede ofrecer al canal propiedades activadoras o inhibitoras y regular la expresión y la propia corriente del canal (Korovkina y England, 2002).

En la regulación de la actividad de los canales K_v también están implicadas distintas sustancias vasoactivas, así por ejemplo, la AII modula negativamente la actividad del canal (Hayabuchi *et al*, 2001) y el H_2O_2 , tiene un efecto contrario al que tiene en los canales BK_{Ca} , pues su papel al incrementar la concentración intracelular de Ca^{2+} , provoca una inhibición en los canales K_v , mientras que provoca una activación en los canales BK_{Ca} (Post *et al*, 1995; Cox y Petrou, 1999).

4.4.- Canales de K^+ inward-rectifying (K_{ir})

Los canales K_{ir} son abundantes en las células de músculo liso vascular en los vasos de resistencia de pequeño calibre. La función exacta de estos canales no está definida completamente, pero se pueden citar dos posibilidades básicas: la primera, los canales K_{ir} contribuyen en el potencial de membrana de reposo y en el tono basal de los vasos de resistencia de pequeño calibre; la segunda, la activación de los canales K_{ir} en respuesta a un moderado incremento de la concentración extracelular de K^+ , causa vasodilatación (Ko *et al*, 2008).

Estructuralmente, los canales K_{ir} son tetrámeros formados por 4 subunidades α , cada una de las subunidades tienen únicamente 2 dominios transmembrana y están unidas a 4 subunidades β , que confieren la funcionalidad al canal. La subunidad α está codificada por miembros de la familia de genes *Kir*, como los anteriormente citados con los canales K_{ATP} (Kubo *et al*, 2005). Existen discrepancias en lo que se refiere a los genes *Kir* que codifican la subunidad α de este tipo de canales. Se ha descrito que la subunidad α está codificada por la subfamilia Kir.2.X (Kir 2.1- Kir 2.4), sugiriendo que Kir2.1, pero no Kir2.2 y Kir2.3, está presente en el músculo vascular (Chrissobolis *et al*, 2000); sin

embargo, se ha sugerido que los canales K_{ir} en las arterias cerebrales contienen Kir2.1 y Kir2.2 (Wu *et al*, 2007^a), además se ha detectado la expresión de Kir 2.1 y Kir2.4 en cultivo celular de músculo liso vascular de arterias pulmonares humanas (Tennant *et al*, 2006).

Los canales K_{ir} son sumamente receptivos a agentes vasoactivos, así, por ejemplo, los vasoconstrictores ET-1 y All inhiben la función del canal por la activación de la PKC y la adenosina estimula la actividad del canal por medio del incremento de los niveles de cAMP y la consecuente activación de la PKA (Park *et al*, 2008^a).

5.- HORMONAS SEXUALES FEMENINAS

5.1.- Síntesis

Los estrógenos y progestágenos son hormonas endógenas que producen gran variedad de efectos fisiológicos. En el caso de las hembras, estas funciones comprenden acciones vinculadas con el desarrollo, efectos neuroendocrinos involucrados en el control de la ovulación, preparación cíclica de las vías de reproducción para la fecundación e implantación del embrión.

Su producción y secreción se produce fundamentalmente en los ovarios, aunque también existe síntesis de estrógenos y progestágenos en la corteza suprarrenal.

Su liberación, en los ovarios, está promovida por la hormona folículo estimulante (FSH) y por la hormona luteinizante (LH), que son sintetizadas en la adenohipófisis y liberadas a su vez en respuesta a la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas hipotalámica (GnRH). Las gonadotropinas (LH y FSH) originan el crecimiento y la maduración del folículo de Graaf en los ovarios y de la producción de estrógenos y progesterona. Las hormonas sexuales, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa sobre neuronas del hipotálamo y células endocrinas de la adenohipófisis, inhiben la producción de FSH y LH y regulan la liberación de GnRH. Además el útero también tiene una actividad endocrina (progesterona, relaxina, prostaglandinas) en respuesta a las hormonas ováricas y estos productos, a su vez, controlan la función ovárica (Tresguerres, 2000) (Figura 12).

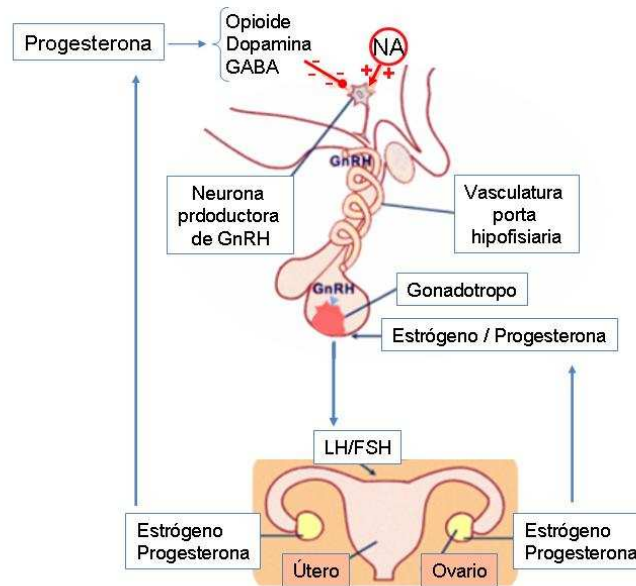


Figura 12: Control neuroendocrino de la secreción de hormonas sexuales, en mujeres. Modificado de Goodman y Gilman (1996).

Estas distintas hormonas no se producen de manera constante a lo largo del ciclo sexual, sino que su secreción es muy distinta en las diferentes etapas del mismo. En el caso de las ratas, el ciclo estral se divide en cuatro fases: estro, metaestro, diestro y proestro (Figura 13).

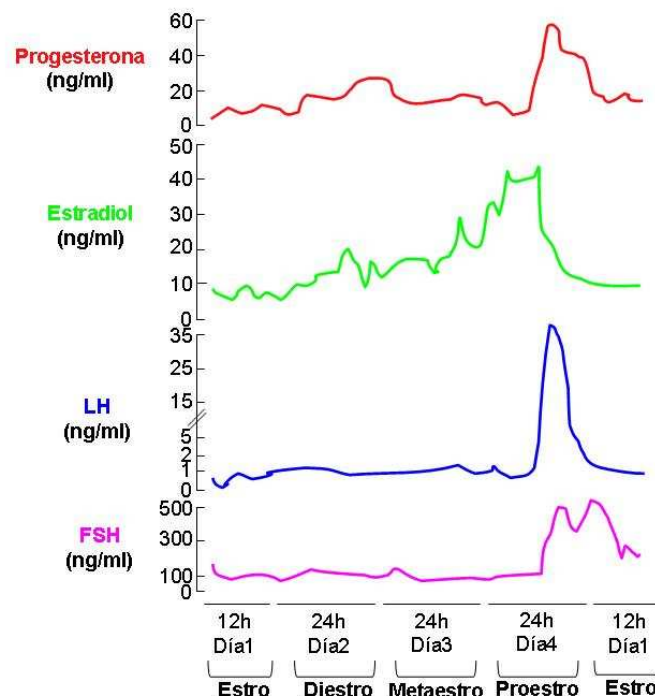


Figura 13: Niveles plasmáticos de los niveles de gonadotropinas (hormona luteinizante: LH y hormona folículo estimulante: FSH) y de esteroides (progesterona y estradiol) durante el ciclo estral de la rata. Modificado de Kinke (2000).

La secreción de hormonas sexuales en la corteza suprarrenal está estimulada por la acción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) liberada por la hipófisis, produciendo fundamental y constantemente dehidroepiandrosterona (DHEA), precursor de los andrógenos y estrógenos. Aún así, la secreción de estrógenos y progesterona a partir de la corteza suprarrenal es mínima y constante a lo largo del ciclo (Guyton y Hall, 2007).

Al igual que el resto de hormonas de naturaleza esteroidea (mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos), los estrógenos se sintetizan a partir del colesterol. La activación de la síntesis de las hormonas esteroideas implica que se produzca hidrólisis de los ésteres de colesterol y tránsito del colesterol a la mitocondria, donde se transforma en pregnenolona, precursor de todas las hormonas esteroideas (Figura 14).

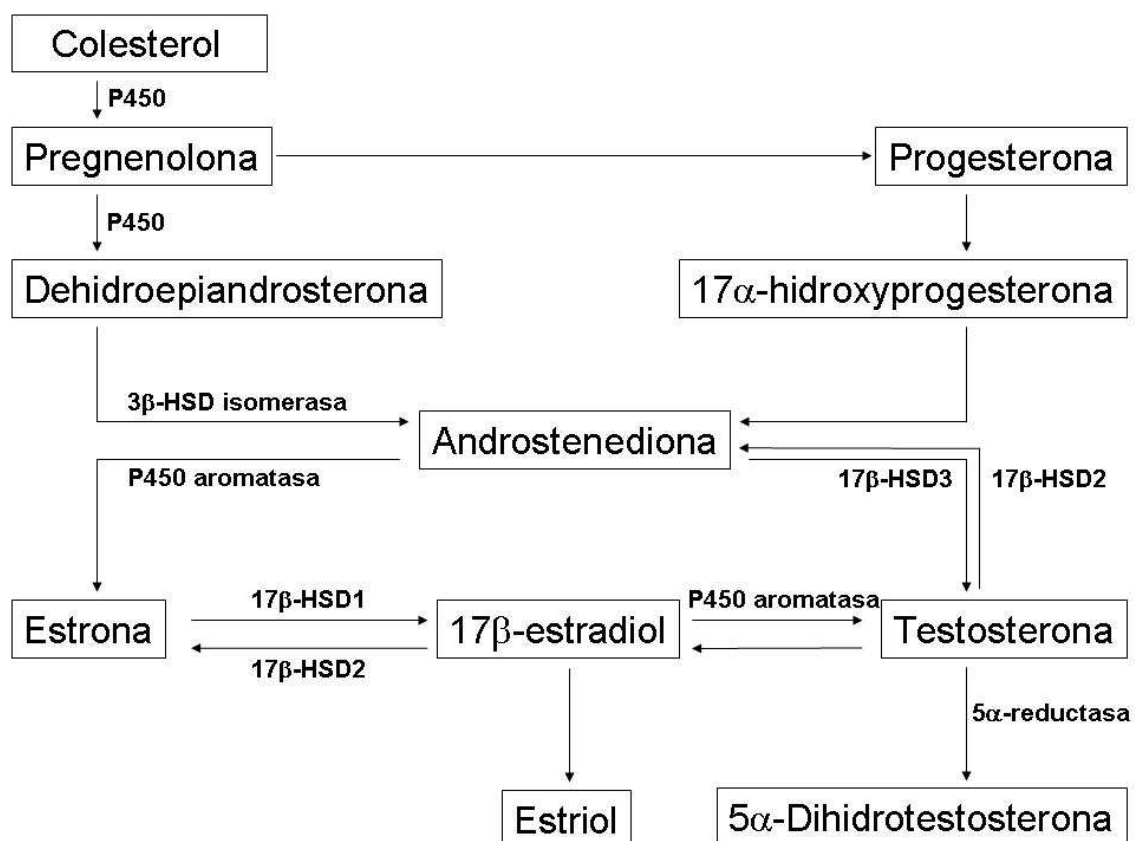


Figura 14. Ruta simplificada de la síntesis de progesterona, estrógenos y testosterona, HSD: hidroxisteroide dehidrogenasa (Modificado de Littleton-Kearney y Hurn, 2004 y ampliado de Mizrahi y Auchus, 2009).

Tanto el estrógeno como la testosterona derivan directamente del producto de la degradación de la pregnenolona, la androstenediona (AD). La regulación de la producción y actividad de los mismos es debida a la actividad de la enzima hidroxisteroide dehidrogenasa (HSD). Han sido descritas dos docenas de enzimas con la actividad de la HSD, pero sólo se conoce los mecanismos de acción de un pequeño número: la 17β -HSD3, cataliza la producción de testosterona (T) a partir de la AD (Geissler *et al*, 1994); la 17β -HSD1, que produce la reducción de estrona (E1) a 17β -estradiol (E2), (Luu-The *et al*, 1995); la 17β -HSD2, que oxida tanto la T como el E2 a sus precursores AD y E1, respectivamente (Wu *et al*, 1993). Todas las HSDs necesitan cofactores nicotínicos para catalizar la reacción de oxidación o reducción de los esteroides, utilizando $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ como fuente de energía, respectivamente (Mizrachi y Auchus, 2009). Algunas HSDs pueden, *in vitro*, catalizar la reacción en ambos sentidos, con un pH y concentración de cofactor determinado, pero, *in vivo*, su acción es unidireccional, porque la reacción es mucho más rápida en un sentido que en el otro. Cada una de estas 3 isoformas ejerce su función en diferentes condiciones, la 17β -HSD1, en la placenta y en el ovario; 17β -HSD3, en los testículos; y 17β -HSD2 en el tejido periférico (Mizrachi y Auchus, 2009). E2 también puede producirse a partir de la T, por la acción de la enzima P450 aromatasa, la cual a su vez también produce la reducción de AD a E1 (Siiteri y MacDonal, 1966).

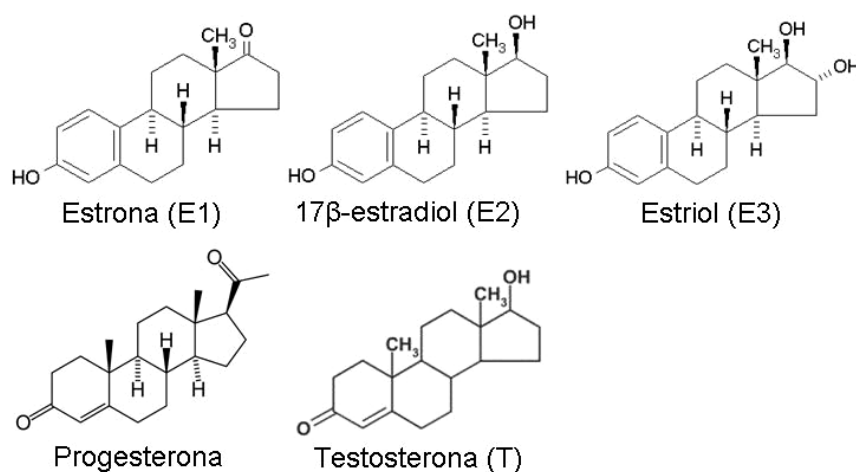


Figura 15. Estructura de los principales estrógenos, de la testosterona y de la progesterona.

5.2.- Efectos vasculares. Mecanismos de acción

Se han identificado receptores de las hormonas sexuales citosólicos y en compartimentos nucleares en varios tipos celulares, incluidas las células endoteliales y células de músculo liso vascular. La interacción de las hormonas sexuales con su receptor citosólico/nuclear estimula un gran número de efectos vasculares genómicos, pero también las hormonas sexuales pueden interaccionar con receptores específicos de membrana e inducir efectos vasculares no genómicos (Orshal y Khalil, 2004).

-Efectos genómicos: El estradiol interacciona intracelularmente con sus receptores estrogénicos (ERs), de los que han sido identificados dos subtipos, ER- α y ER- β (Mendelsohn, 2002), ambos pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales nucleares codificados por distintos genes localizados en diferentes cromosomas (Dahlman-Wright *et al*, 2006), multitud de mecanismos incluyendo cambios epigenéticos, metilaciones específicas de DNA, *splicing* de RNA alternativo, etc., pueden provocar multitud de isoformas de cada uno de los receptores, así, metilaciones de los genes de ambos ER α y ER β , están asociados con aparición de aterosclerosis (Miller y Duckles, 2008).

El mecanismo de acción génico de los distintos esteroides es que el complejo receptor-ligando se transloca al núcleo donde la hormona ejerce su función alterando la transcripción génica (Littleton-Kearney y Hurn, 2004); el E2 induce la migración y proliferación endotelial (Gerald *et al*, 2002) así como la fosforilación de las MAPK, inhibiendo su actividad en las células de músculo liso (Dubey *et al*, 1999) e inhibe el crecimiento celular, por la activación de la PKA en las células de músculo liso (Dubey *et al*, 2000)

-Efectos no genómicos: Datos recientes de la acción vascular del 17 β -estradiol, indican que las hormonas sexuales femeninas modulan la reactividad vascular. Muchas de estas acciones se presentan como mecanismos independientes a los efectos genómicos, anteriormente descritos, desencadenando cascadas de señalización endotelio-dependientes o endotelio-independientes (Leung *et al*, 2007). Por ejemplo, los estrógenos pueden estimular la relajación vascular mediada por efectos endotelio-dependientes participando en las rutas NO-cGMP, PGI₂-cAMP y canales de potasio; y en mecanismos endotelio-independientes como es inhibiendo posibles mecanismos de señalización en la

contracción de las células musculares lisas, a través de la concentración intracelular de Ca^{2+} y/o la regulación molecular PKC o PKA o de sus cofactores lipídicos (Orshal y Khalil, 2004; Dubey *et al*, 2000). Se ha descrito que el posible receptor que activa esta variabilidad de mecanismos es el receptor estrogénico acoplado a una proteína G (GPER), sin embargo no existe todavía una certeza científica de ello (Miller y Duckles, 2008).

Endotelio vascular

Las hormonas sexuales inducen la estimulación de mecanismos endotelio-dependientes que contribuyen en las diferencias del tono vascular en los distintos sexos (Orshal y Khalil, 2004). La producción total de NO es mayor en mujeres premenopáusicas que en hombres (Forte *et al*, 1998) y los estrógenos parecen ser los responsables de estas diferencias (Darkow *et al*, 1997; Knot *et al*, 1999).

Los estrógenos incrementan la expresión de NOS, pues se ha visto que al transferir genes de ER α en células endoteliales de aorta de bovino, se incrementa la expresión de NOS (Tan *et al*, 1999); también pueden regular la actividad de NOS, y por lo tanto la producción de NO y ejercer su efecto sobre el tono vascular. Paralelamente, los estrógenos producen un incremento en la liberación de monóxido de carbono (CO), en los niveles de la enzima hemoxygenasa 2 (HO-2) y en los niveles de cGMP, sugiriendo al CO como una posible molécula mediante la cual los estrógenos regulan el tono vascular (Tschugguel *et al*, 2001).

Se ha descrito que los estrógenos pueden aumentar la expresión de la enzima ciclooxigenasa (COX), y la síntesis de PGI₂ en células endoteliales de la vena umbilical humana (Jun *et al*, 1998), pero por el contrario parece que los prostanoïdes no participan en la relajación inducida por estrógenos en arterias coronarias (Jiang *et al*, 1991).

También se ha descrito que los estrógenos participan en el grado de hiperpolarización de la membrana, puesto de se ha visto que en arteria mesentérica la hiperpolarización y relajación inducida por ACh es menor en ratas ovariectomizadas que en las ratas hembras intactas y esta diferencia en la respuesta a ACh se elimina al bloquear en ambos casos los canales de K⁺ (Sakuma *et al*, 2002). También se ha visto como los estrógenos modulan la

producción de ROS, mediante la regulación de las proteínas implicadas en la respiración mitocondrial, y la expresión y actividad de SOD (Strehlow *et al*, 2003) actuando como agentes antioxidantes. Estructuralmente los estrógenos poseen un protón en el grupo hidroxilo de su anillo aromático que puede detoxificar el medio de O_2^- (Behl *et al*, 1997), es decir los estrógenos tiene la capacidad de atenuar el estrés oxidativo y la inflamación a través de sus propiedades antioxidantes, sin embargo, los estrógenos también pueden tener propiedades proinflamatorias incrementando la producción de O_2^- a través del desacoplamiento de la eNOS (Chakrabarti *et al*, 2008).

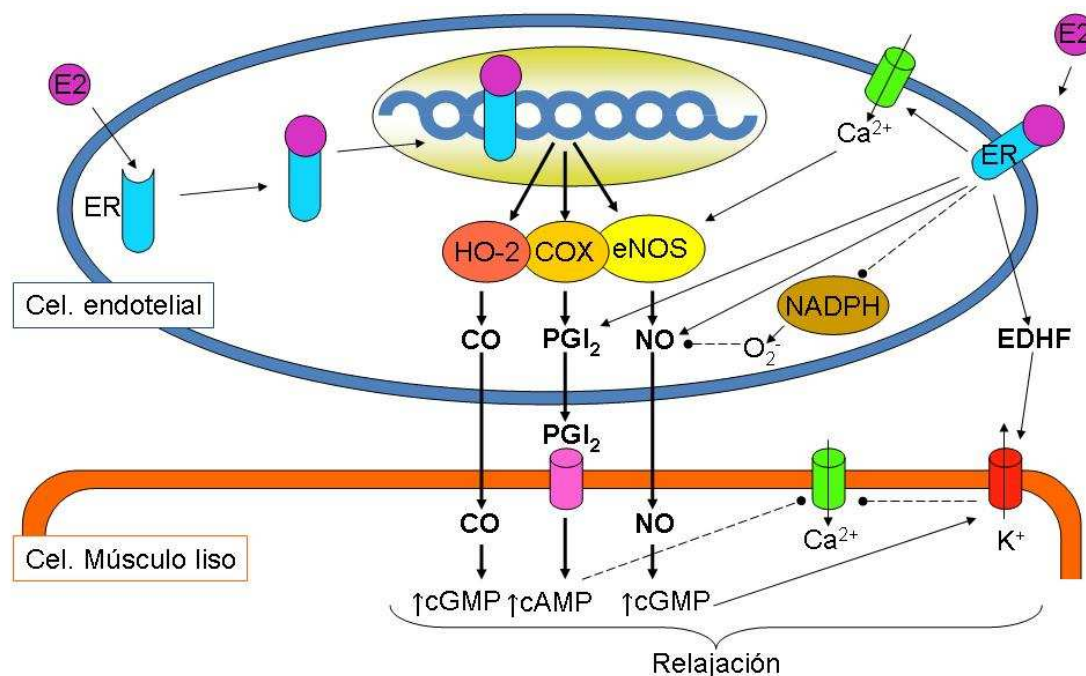


Figura 16: Representación de los efectos de los estrógenos en las células endoteliales. Efectos genómicos: el estrógeno (E2) se une a sus receptores estrogénicos citosólicos/ nucleares (ER) y se trasloca al núcleo, donde incrementa la transcripción génica, la proliferación celular y la expresión de eNOS, COX y HO-2. Efectos no genómicos: el E2 unido a sus ER de membrana, activa el incremento de Ca^{2+} intracelular a través de los canales de Ca^{2+} y de la salida del retículo endoplasmático (no mostrado en el dibujo) que activa a la eNOS provocando un incremento de los niveles de NO. El complejo E2-ER puede inactivar la producción de O_2^- a través de la NADPH, previniendo la inactivación del NO con los O_2^- y activar la COX, provocando un incremento de PGI_2 . Los estrógenos producen también un incremento en la liberación de CO. E2-ER puede incrementar la producción del factor hiperpolarizante derivado de endotelio que activa los canales de K^+ causando hiperpolarización e inhibiendo la entrada de Ca^{2+} . Todos estos efectos inducen en el músculo liso vascular relajación (Modificado de Orshal y Khalil, 2004)

El papel de la progesterona no está tan definido, aunque, parece que su función contrarresta la estimulación de los estrógenos en la vasorrelajación endotelio-dependiente (Miller y Vanhoutte, 1991). También se ha descrito que la progesterona puede ejercer su efecto directo a través de mecanismos no genómicos activando la COX e incrementando la síntesis de PGI_2 en aorta de rata (Selles *et al*, 2002).

La estrona incrementa la producción de NO endotelial mediante efectos genómicos a través del incremento de la actividad de la MAPK y también incrementa la liberación de la PGI_2 (Rauschemberger *et al*, 2008).

Músculo liso vascular

Se han descrito distintas respuestas a donantes de NO en diferentes vasos entre machos y hembras, sugiriendo que existen diferencias de sexo en la respuesta mediada por el NO en las células de músculo liso vascular y de la existencia de una posible regulación hormonal. Se ha observado como los estrógenos causan la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) provocando una mayor liberación de cAMP, que activa a la PKA; Speir *et al* (2000) sugieren que el estradiol mediante mecanismos no-genómicos inhibe al factor de transcripción NF- κ B y la liberación de ROS obteniendo una consecuente protección de la PKA sobre la oxidación, pero también se ha descrito que el cAMP puede tener reactividad cruzada y activar a la PKG (Komalavilas y Lincoln, 1996) provocando una regulación de los estrógenos sobre los canales de K^+ (Kähönen *et al*, 1998).

Así mismo, se ha descrito que los estrógenos participan en la regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Murphy y Khalil, 2000), pueden directa o indirectamente actuar sobre los canales plasmáticos de Ca^{2+} , como por ejemplo, estimulando la extrusión de Ca^{2+} a través de la activación de la Ca^{2+} /ATPasa (Prakash *et al*, 1999) o a través de la activación de los canales BK_{Ca} (White *et al*, 1995).

También se ha descrito como los estrógenos, por vía de mecanismos genómicos, regulan la actividad de la MAPK, inhibiendo la proliferación celular (Orshal y Khalil, 2004)

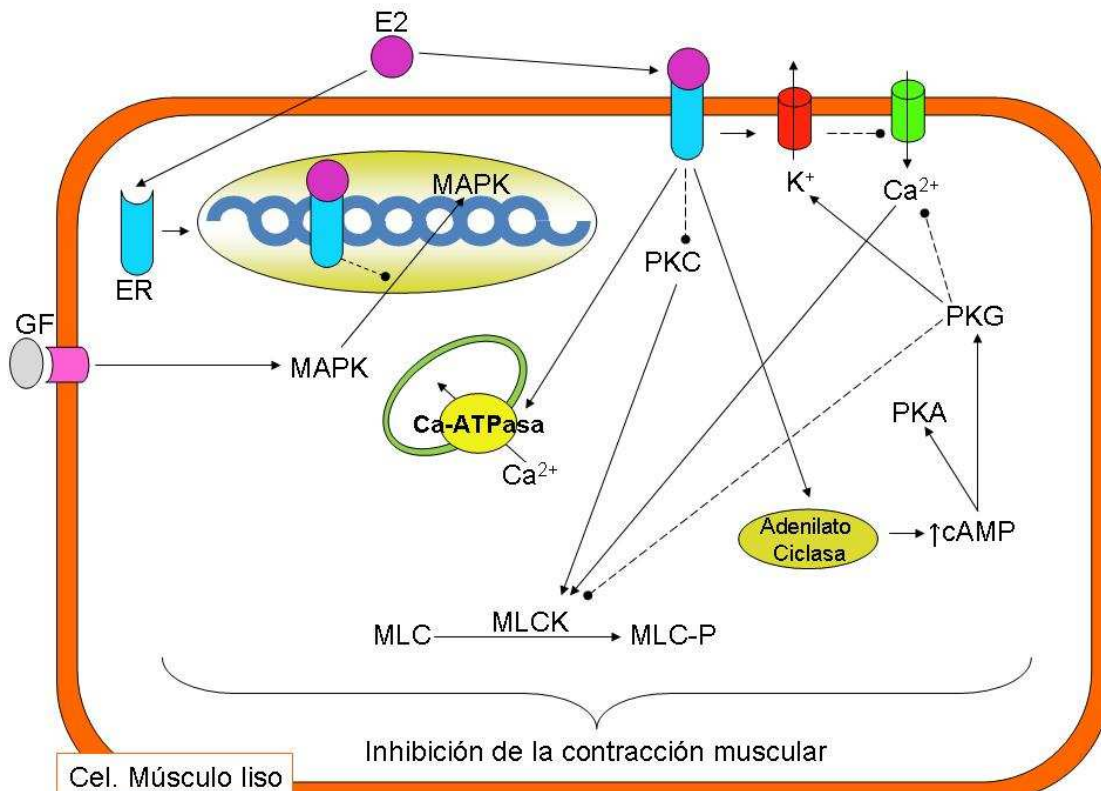


Figura 17: Representación de los efectos de los estrógenos en las células de músculo liso vascular. En los efectos genómicos, el estrógeno (E2) se une a sus receptores estrógenicos citosólicos/nucleares (ER) y se trasloca al núcleo, donde inactiva la transcripción génica y la proliferación celular, al inhibir la estimulación de los factores de crecimiento (GF) sobre la MAPK. En los efectos no genómicos el complejo E2-ER de membrana activa la hiperpolarización de la membrana activando los canales de K⁺ directamente, lo cual inhibe la entrada de Ca²⁺ a través de los canales de Ca²⁺ de membrana, e inhibe la actividad de la PKC que participa sobre la MLCK (quinasa de la cadena ligera de miosina). El complejo E2-ER de membrana estimula la acción de la Ca²⁺-ATPasa, disminuyendo la concentración de Ca²⁺ intracelular e impidiendo la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC), necesaria para que se produzca la contracción. También el E2-ER activa la adenilato ciclasa e incrementa la liberación de cAMP, el cual activa a la PKA y PKG. La PKG activa los canales de K⁺ e inhibe la entrada de Ca²⁺ por sus canales específicos. El resultado de todos estos mecanismos es mantener la relajación o disminuir la contracción del músculo liso vascular.

El papel de la progesterona, en relación a los niveles de Ca²⁺ intracelular, no está claramente definido, sin embargo, se ha descrito que la aplicación de la progesterona, disminuye la entrada de Ca²⁺ y por tanto la concentración de Ca²⁺ en células de músculo liso coronaria de conejo y porcino (Murphy y Khalil, 1999).

La estrona puede actuar mediante mecanismos genómicos y no genómicos (Rauscherberger *et al.*, 2008). Se ha descrito que la estrona incrementa rápidamente la actividad de la PLC, incrementando la generación de diacylglicerol (Massheimer *et al.*, 2006), promueve la proliferación de las

células de músculo liso vascular, mediante su efecto sobre la actividad de la PKC y que incrementa la síntesis de NO por activación de la cascada de señalización de la MAPK (Rauscher et al, 2008).

6.- ENVEJECIMIENTO.

El envejecimiento se puede definir como un proceso multifactorial que induce una serie de cambios en las células y tejidos que van disminuyendo progresivamente la capacidad de mantenimiento de la homeostasis, aumentando la vulnerabilidad del organismo e incrementando el riesgo de sufrir enfermedades y muerte (Harman, 2001)

6.1- El envejecimiento y la función vascular

El envejecimiento, *per se*, es uno de los mayores factores de riesgo para el sistema cardiovascular, ya que, está asociado con la aparición de anomalías de la pared vascular, tanto estructurales como funcionales. Uno de los principales cambios que ocurre con el envejecimiento es la **disfunción endotelial**, esto es, se produce una alteración en el equilibrio de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras derivadas del endotelio (Matz y Andriantsitohaina, 2003; Versari et al, 2009). La consecuencia más obvia de la disfunción endotelial, es la disminución de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio y esto es consecuencia de una alteración en la expresión o actividad de la eNOS, sobreexpresión de la iNOS e incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Versari et al, 2009). Se le ha asociado al envejecimiento con una reducción de la capacidad regenerativa del endotelio y con senescencia endotelial (Yildiz, 2007), adicionalmente, se describió la posibilidad de que estuvieran alterada la expresión de eNOS y/o la liberación de NO (Marín y Martín-Rodríguez, 1999), así como la liberación de cGMP (Ferrer et al, 1998).

Se ha descrito que, en el envejecimiento, está incrementado el tono vasoconstrictor mediado por ET-1 (Stauffer et al, 2008), y disminuida la respuesta inducida por donantes de NO (Wu et al, 2007^b; Stice et al, 2009). En este sentido, el envejecimiento está relacionado con un incremento de la expresión de COX-1 y una mayor liberación de prostanoídes vasoconstrictores

(Tang y Vanhoutte, 2008). Se ha demostrado que el envejecimiento está asociado con el impedimento progresivo en la función endotelial tanto en arterias de conductancia como vasos de resistencia, principalmente por el incremento en la producción de ROS (Versari *et al*, 2009).

Se ha descrito que el envejecimiento induce una reducción de la subunidad α de los canales BK_{Ca} en las células de músculo liso coronarias (Yildiz, 2007) y un incremento de la expresión de los receptores de los derivados de COX-1 y de PGE₂ en las células musculares (Tang y Vanhoutte, 2008).

En el envejecimiento las células de músculo liso vascular migran progresivamente de la túnica media para acumularse en la túnica íntima. También está asociado con cambios de proliferación, de comportamiento apoptótico y de respuesta a distintos factores de crecimiento. Estas alteraciones en las propiedades de las células de músculo liso vascular representan un episodio crucial en la biología de la pared arterial que favorece el desarrollo de la aterosclerosis (Orlandi *et al*, 2006).

6.2- El envejecimiento y las hormonas sexuales

El envejecimiento está relacionado con una disminución de los niveles de hormonas sexuales endógenas circulantes afectando a numerosas funciones del organismo de la mujer, entre otras la función cardiovascular. Se ha descrito que con el envejecimiento los niveles de estrógenos circulantes disminuyen y que además pierden afinidad por sus receptores citosólicos/nucleares y de membrana. También se ha descrito que el envejecimiento disminuye (Qiao *et al*, 2008) o no modifica (Stice *et al*, 2009) la expresión de eNOS.

Sobre la cascada de señalización del NO, se ha citado que en envejecimiento no altera (Briones *et al*, 2005) o disminuye (Stice *et al*, 2009) la expresión de sGC, así como una disminución en la actividad de sGC (Moritoki *et al*, 1992) o en la afinidad del NO (Stice *et al*, 2009).

La pérdida de las hormonas sexuales endógenas tras la menopausia va acompañado de un deterioro de la función del sistema inmune con una superproducción de ROS y citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF α (Chakrabarti *et al*, 2008). Todo ello hace que la probabilidad de sufrir enfermedades cardiovasculares se incrementa tras la menopausia como está descrito epidemiológicamente. Además, el envejecimiento supone un elemento

fundamental en la aparición de algunos factores de riesgo cardiovasculares como dislipemias, diabetes o hipertensión.

En este sentido, se ha descrito que a lo largo del envejecimiento pueden existir cambios en los niveles de presión sanguínea en ambos sexos (Landahl *et al*, 1986), en concreto en muchas mujeres dichos cambios suceden después de la menopausia, pero el mecanismo responsable no está todavía descrito (Reckelhoff y Fortepiani, 2004). Se han descrito que las modificaciones que producen el envejecimiento o la hipertensión en la regulación del tono vascular son similares (Tang y Vanhoutte, 2008), sin embargo, estos cambios no siempre van unidos.

La importancia de conocer e evitar la hipertensión en el envejecimiento, tiene un gran interés, ya que la hipertensión es un factor de riesgo de distintas enfermedades cardiovasculares (Reckelhoff y Fortepiani, 2004). Epidemiológicamente el índice de sufrir enfermedades cardiovasculares está relacionado con el sexo, puesto que en humanos, los varones sufren más episodios que las mujeres premenopáusicas igualándose dichas diferencias tras la menopausia. Por esto tradicionalmente se le ha otorgado, a las hormonas sexuales femeninas endógenas, un papel protector en el sistema cardiovascular, considerándose, su ausencia, la causa de que en mujeres postmenopáusicas se produjera la hipertensión u otras enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la disminución de los niveles de hormonas sexuales endógenas, y los cambios fisiológicos que ello conlleva, no constituye la única causa de la presencia de hipertensión en el envejecimiento. Muchos han sido los estudios realizados con terapia sustitutiva estrogénica en pacientes postmenopáusicas hipertensas que han intentado revertir la hipertensión, pero no todos lo han conseguido (Harrison-Bernard y Raji, 2000), indicando la existencia de otros factores. En este sentido, se ha relacionado la aparición de la hipertensión en el envejecimiento con el incremento del índice de masa corporal, más que con la pérdida funcional ovárica (Portaluppi *et al*, 1997).

Muchos son los estudios que intentan demostrar cómo se revierten algunas alteraciones concretas producidas por la menopausia y el envejecimiento con una terapia sustitutiva de hormonas sexuales, en concreto de 17 β -estradiol. Sin embargo, existe gran controversia sobre los efectos beneficiosos de la terapia

estrogénica en mujeres postmenopáusicas ya que han producido efectos perjudiciales (Teede, 2007). También, en pacientes con menopausia precoz se han observado anomalías vasculares, que no se revierten con una terapia estrogénica (Kalantaridou *et al*, 2005), indicando la existencia de otros factores derivados de los ovarios, diferentes a los estrógenos, implicadas en la regulación de la función vascular.

Existen numerosos estudios funcionales y mecanísticos que analizan el efecto de una determinada hormona sexual, fundamentalmente los estrógenos, sobre los efectos inducidos por la ovariectomía con resultados muy distintos. Esta situación pone de manifiesto la complejidad de los sistemas biológicos, y que en las alteraciones cardiovasculares producidas por la pérdida de función ovárica participan otras hormonas diferentes a los estrógenos. También es importante señalar que los resultados pueden estar condicionados por el modelo y las condiciones experimentales utilizadas.

Con todos estos datos, sería importante conocer los mecanismos intracelulares por los que la función ovárica regula el tono vascular, tanto en la edad adulta como en el envejecimiento.

Puesto que el NO ejerce un papel crucial en el mantenimiento de la función vascular, se estudiara su participación en la respuesta vasodilatadora analizando las posibles alteraciones en su vía de señalización.

Este estudio, nos permitirá ampliar información acerca de los mecanismos reguladores de las hormonas sexuales femeninas sobre la función vascular.

Objetivos

Los objetivos concretos del presente trabajo ha sido analizar, en aorta de rata, el efecto de la función ovárica y su posible modificación en el envejecimiento sobre:

1. Los niveles séricos de progesterona, estrona, 17β - estradiol y testosterona
2. Los aniones superóxido, valorando:
 - i. formación de aniones superóxido;
 - ii. expresión y actividad de las SODs;
3. La vía de señalización del NO endotelial, valorando:
 - i. expresión de eNOS;
 - ii. liberación y función de NO endotelial;
 - iii. formación de cGMP;
 - iv. actividad de PKG, PKA, PKC;
 - v. participación del NO endotelial, sGC y PKG en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh;
 - vi. participación de la actividad de la PKG sobre la liberación y función de NO endotelial.
4. Los canales de K_{Ca} y K_{ATP} , valorando:
 - i. expresión de los canales K_{Ca} y K_{ATP}
 - ii. participación de los canales K_{Ca} y K_{ATP} en la liberación de NO endotelial, y la respuestas inducidas por ACh y NPS;
 - iii. efecto regulador de la PKG sobre la respuesta relajadora inducida por la activación de los canales K_{Ca} .

Materiales y Métodos

1.- Animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley jóvenes (6 meses) y viejas (20-22 meses) divididos en dos grupos, ratas controles y ovariectomizadas. Todos los animales fueron estabulados en el animalario de la Universidad Autónoma de Madrid (Número de Registro EX021U) de acuerdo con las normas establecidas por la Unión Europea en la directiva del Consejo 609/86/CEE, recogidas en el B.O.E. nº 256 de 25/10/90 y R.D. 233/88 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (12 horas de ciclo luz/oscuridad y alimentación estándar con pienso y agua *ad libitum*).

La ovariectomía bilateral se realizó a las 4 semanas de edad mediante intervención quirúrgica. La comprobación de que la operación había sido efectiva se realizó analizando la ausencia de ciclos ováricos mediante frotis vaginal y al observar la atrofia uterina tras el sacrificio del animal. Los animales controles se sacrificaron en fase estro, analizada por frotis vaginal.

El sacrificio del animal se produjo mediante la inhalación de CO₂ y posterior decapitación. La arteria aorta y el útero fueron cuidadosamente diseccionados eliminando el tejido conectivo. Para el lavado y mantenimiento se utilizó la solución fisiológica de Krebs-Henseleit (KHS) a 4°C. La investigación se realizó de acuerdo con las directrices "*Guide for the Care y Use of Laboratory Animals*", publicada por *USA National Institute of Health* (NIH publicación número 85-23, revisado en 1996) y la legislación española para el uso de animales de experimentación (R.D 1205/2005).

2.- Presión arterial

En todos los grupos animales, a los 6 y 20 meses de edad se midió la presión arterial de forma indirecta mediante el método de pletismografía de la arteria caudal descrito por Buñag (1974).

3.- Niveles séricos de progesterona, estrona, 17 β -estradiol y testosterona.

La extracción de la sangre se realizó mediante punción cardiaca y tras dos horas expuesta a temperatura ambiente se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 15 minutos, obteniéndose el suero sanguíneo.

El suero recolectado se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización. Los niveles séricos de progesterona, estrona, 17β -estradiol y testosterona analizados, se midieron utilizando los kit comerciales de Cayman Chemical (*Progesterone Estrone, Estradiol, Testosterone enzyme immunoassay kit*). Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados obtenidos de los niveles de progesterona se expresaron en ng/ml y los niveles de estrona, 17β -estradiol y testosterona en pg/ml.

4.- Reactividad vascular

Para medir la tensión isométrica, se utilizó la técnica descrita por Nielsen y Owman (1971). Para ello se colocaron los segmentos arteriales en un baño de órganos que contiene 5 ml de la solución de KHS a 37°C en continuo burbujeo con AlphagazTM mix 5% CO_2/O_2 (O_2 95% y CO_2 5%) proporcionando un pH 7.4-7.6; a través del lumen de los segmentos arteriales, se introdujeron dos alambres de acero paralelos entre sí y con el segmento, estando uno de los alambres fijo a la pared del baño, y el otro móvil conectado a un transductor de fuerza (Grass FTO3C), lo que permite la aplicación de tensión perpendicular al eje longitudinal de los segmentos arteriales, la cual se registra en un polígrafo (Grass modelo 7D) conectado a dicho transductor. Los segmentos de aorta fueron sometidos a una tensión de 1g, siendo reajustada cada 15 minutos durante un periodo de estabilización de 90 minutos previo a la administración de cualquier fármaco (Figura 18).

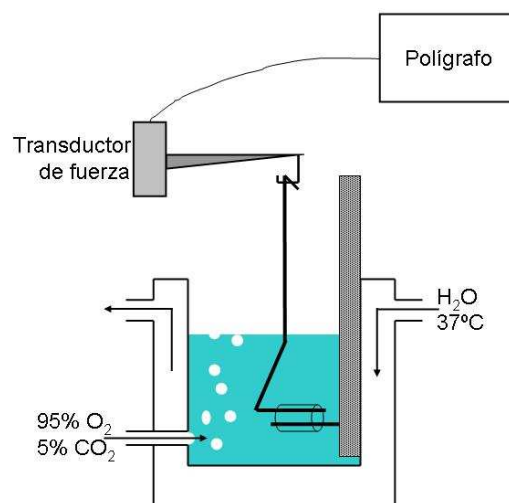


Figura 18: Esquema del baño de órgano aislado

En primer lugar se aplicó a las arterias una solución de KCl (75 mM) para comprobar su integridad funcional y en segundo lugar, después de un periodo de lavado y recuperación del tono basal, se comprobó la presencia de endotelio, observando el efecto que produce la adición de ACh (10 μ M) a los segmentos arteriales previamente precontraídos con noradrenalina (NA, 1 μ M). Tras un periodo de lavado y recuperación del tono basal, se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh (10 nM-10 μ M), al donante de NO, nitroprusiato sódico (NPS; 10 nM-10 μ M) y al activador selectivo de los canales BK_{Ca} (NS-1619; 10 nM-10 μ M).

Para determinar la participación de NO y de su cascada de señalización, se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh en presencia del inhibidor de la síntesis de NO, N(G)-nitro-L-arginine metilester (L-NAME, 0.1 mM) y del inhibidor de la sGC, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μ M) en las arterias procedentes de animales jóvenes y viejos, control y ovariectomizados.

Para estudiar el posible papel de los canales BK_{Ca} o de K_{ATP} se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh y NPS en los segmentos arteriales precontraídos con NA, en presencia o ausencia de de sus inhibidores específicos, Charibdotoxina (0.1 μ M) y Glibenclamida (10 μ M) respectivamente. Para analizar la participación de la PKG en la relajación inducida por ACh y NPS en arteria procedentes de todos los grupos de animales, se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh y NPS incubando con el inhibidor de la PKG, KT-5823 (1 μ M).

Para examinar el posible papel de los O₂⁻ se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh, y a NPS en los segmentos arteriales precontraídos con NA, en presencia del mimético de la SOD permeable a la membrana, tempol (0.1 mM), en arterias procedentes de animales control y ovariectomizados.

Para analizar el papel de la PKG en la respuesta mediada por la activación de los canales de BK_{Ca}, se realizaron curvas concentración-respuesta, al activador selectivo de los canales BK_{Ca}, NS-1619, en los segmentos arteriales precontraídos con NA, en presencia o ausencia de KT-5823 (1 μ M).

La relajación fue calculada como el porcentaje de inhibición de la contracción inicial obtenida con la NA (1 μ M).

5.- Liberación de NO endotelial

La liberación de NO endotelial en las aortas se midió utilizando la sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) según la técnica descrita por Martín *et al*, (2005). Este compuesto penetra en las células, donde es hidrolizado por las esterasas citosólicas y transformado en 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) que a su vez reacciona con el NO para formar el producto fluorescente triazolfuoresceína (DAF-2T), cuantificable mediante la utilización de un filtro de excitación de 492 nm y un filtro de emisión de 515 nm. Para realizar los experimentos, los segmentos de aorta procedentes de los animales jóvenes y viejos, control y ovariectomizados fueron sometidos a la tensión de 1g, como se indicó en los experimentos de reactividad vascular. Después de un periodo de estabilización de 60 minutos, los segmentos arteriales fueron incubados durante 45 minutos en una solución de HEPES (pH 7,4) con DAF-2 (0,5 μ M), y posteriormente se recogió el medio para medir la liberación basal de NO endotelial.

Una vez repuesto el medio y para medir la liberación de NO endotelial inducida por la ACh, los segmentos arteriales se expusieron a una dosis de NA (0.1 μ M) durante 2 minutos y seguidamente a concentraciones crecientes de ACh (0.1 nM-10 μ M) a intervalos de 1 minuto.

La fluorescencia del medio fue medida a temperatura ambiente con un espectrofluorímetro (LS50 Pekín-Elmer Instruments, FL WINLAB Software, Bucks, UK). La liberación de NO endotelial inducida por ACh se calculó sustrayendo la liberación basal del NO de la producida por el estímulo. Se realizaron simultáneamente las medidas del medio sin arteria (blancos) para restar la emisión de fondo. Algunos experimentos se realizaron en presencia de L-NAME (0.1 μ M) para asegurar la especificidad del método. Para analizar el papel de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} y el papel de la PKG sobre la liberación de NO endotelial las arterias se incubaron con Charibdotoxina (0.1 μ M, inhibidor de BK_{Ca}), Glibenclamida (10 μ M, inhibidor de K_{ATP}) o KT-5823 (1 μ M, inhibidor selectivo de PKG), durante 30 minutos antes de la medición basal y durante la estimulación de ACh.

La cuantificación de la liberación del NO endotelial está expresada en unidades arbitrarias por miligramo de tejido (U.A./mg).

6.- Expresión de proteínas.

La expresión eNOS, Cu/ZnSOD, MnSOD, subunidades α y β de BK_{Ca}, subunidades Kir6.1 y SUR2B de K_{ATP} y actina se llevó a cabo mediante Western Blot.

6.1.- Preparación de las muestras

Para el análisis de expresión de las distintas proteínas, los segmentos de aorta fueron homogeneizados en un buffer de homogenización compuesto por: 1mM de Vanadato Sódico (inhibidor proteico), 1% SDS y 0'01M Tris-HCl (pH 7'4). Los homogenizados se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4° y los sobrenadantes fueron recolectados para medir el contenido proteico, utilizando el Kit comercial *DC protein assay* (BioRad) basado en un ensayo colorimétrico. La lectura del ensayo se realizó en un lector de placas (Multiskan Ascent, Labsystems) con un máximo de absorción a 750nm y un mínimo 405nm, utilizando el programa Ascent Software. Se tomaron 20 μ g de proteína de la fracción soluble del homogenado y se les añadió un tampón de rotura y solubilización, tampón Laemmli (Laemmli, 1970) que contiene: 100 mM ditiotretitol, 0.1% glicerol, 2% SDS y 60 mM Tris-HCl (pH 6.8). Para proceder a la desnaturalización de las proteínas, las muestras preparadas fueron llevadas a ebullición a 90° durante 10 minutos.

6.2.- Electroforesis

Las muestras fueron electroforéticamente separadas en geles de poliacrilamida, SDS-PAGE (SDS-PAGE 7'5% para eNOS, subunidad α de BK_{Ca}, SUR2B de K_{ATP} y SDS-PAGE 12% para Cu/ZnSOD, MnSOD, subunidad β de BK_{Ca}, Kir6.1 de K_{ATP}) con un voltaje constante de 97 V en un Mini Protean III System (BioRad). Como marcador de peso molecular se utilizó SDS-Page broad-rang (BioRad Laboratories) y como control positivo lo indicado por la casa comercial en cada uno de los análisis.

6.3.- Transferencia y detección inmunológica

Los geles de poliacrilamida fueron transferidas a unas membranas de polivinil difloride (*Immun-Blot™ PVDF Membrane*, Bio-Rad Laboratories) toda la noche a 4°C, 230mA para eNOS, utilizando un Mini Trans-Blot System (Bio-Rad Laboratories) y 30 minutos a temperatura ambiente, 20 V , para Cu/ZnSOD, MnSOD, las subunidad α y β de los canales BK_{Ca}, las subunidades Kir6.1 y SUR2B de los canales K_{ATP} y actina utilizando Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) en un buffer de transferencia que contiene 25mM Tris (pH 8.3), 190 mM glicina, 20% metanol y 0.05% SDS.

Todas membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución salina TBS (100mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.9% (w/v) NaCl, 0.1% SDS) con 5% leche no grasa en polvo.

Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (Tabla 4) previamente diluido en la solución salina PBS + 5% leche no grasa, según el título del mismo y después, con su correspondiente anticuerpo secundario (Tabla 5) durante 2 horas a temperatura ambiente. Ambos anticuerpos secundarios están conjugados con peroxidasa de rábano.

	Dilución	Secundario	Casa Comercial
Anti-eNOS	1:1000	Anti-mouse	Transduction Laboratories (Lexington, UK)
Anti-Cu/ZnSOD	1:1000	Anti-rabbit	StressGen Bioreagents (Victoria, Canada)
Anti-α (BK_{Ca})	1:500	Anti-rabbit	Chemicon International (California, USA)
Anti-β (BK_{Ca})	1:250	Anti-rabbit	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Kir6.1 (K_{ATP})	1:100	Anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)
Anti-SUR2B (K_{ATP})	1:100	Anti-goat	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)
Anti-actina	1:3000	Anti-mouse	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO – USA)

Tabla 4: Anticuerpos Primarios utilizados en los experimentos de Western Blot

	Dilución	Casa Comercial
Goat anti-mouse	1:1000	Amersham International Plc (New Jersey, USA)
Goat anti-rabbit	1:1000	Amersham International Plc (New Jersey, USA)
Donkey anti-goat	1:10000	Santa Cruz Biotechnology (California, USA)

Tabla 5: Anticuerpos Secundarios utilizados en los experimentos de Western Blot

Finalmente, se eliminó el exceso de anticuerpo secundario mediante lavados en TBS+Tween y las proteínas correspondientes fueron detectadas por una reacción de quimioluminiscencia utilizando el sistema de detección ECL Plus (Amersham International Plc). A continuación, las membranas se pusieron en contacto con las películas fotográficas (Hyperfilm ECL, Amersham International Plc) en la que quedaron impregnadas las bandas para su posterior revelado (Curix 60, Agfa).

Las señales de las bandas fueron densitometradas con el programa informático Scion Image of Windows (© 2000 Scion Corporation) y normalizadas en función de la carga proteica. En todos los experimentos de Western Blot se cargó 20 µg de cada muestra.

7.- Producción de aniones superóxido

7.1.- Localización de aniones superóxido

Para evaluar los niveles de O_2^- *in situ*, se utilizó la sonda fluorescente hidroethidina (HE) según la técnica descrita previamente por Martin *et al*, (2005). Brevemente, los segmentos aórticos de todos los grupos animales fueron crioprotegidos con 30%w/v de sacarosa en PBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente fueron embebidos en el compuesto OCT (*optimum cutting temperature compound*, OCT Tissue Tek) y fueron seccionados en anillos de 15-20 µm, utilizando un criostato (Criostato Cryocut1900). Los anillos seccionados fueron incubados con HE (5 µM) en una solución HEPES protegidos de la luz e incubados en una cámara humidificadora a 37°C durante 30 minutos. Tras el periodo de incubación, los anillos seccionados fueron montados en portas y fijados en Glicerol al 60% para su posterior visualización con un microscopio confocal con escáner laser LEICA (TCS ST2 DM IRE2) utilizando un filtro de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 610 nm. Las microfotografías muestran la intensidad y localización de la HE oxidada, lo que refleja los niveles de O_2^- , y permite la comparación entre los grupos de animales experimentales.

7.2.- Cuantificación de aniones superóxido

Los niveles de O_2^- fueron cuantificados midiendo la quimioluminiscencia emitida por la lucigenina, como fue descrito por Pagano *et al*, (1995) y Wang *et al*,

(1999) y adaptado en nuestro grupo por Martín *et al* (2005). Brevemente, el protocolo consistió en estabilizar los segmentos de aorta durante 30 minutos en KHS y posteriormente en HEPES durante otros 30 minutos a 37°C. A continuación se transfirieron a los tubos de medida con 1 ml HEPES (pH 7.4) con lucigenina (250 μ M) a 37°C. El luminómetro se calibró para obtener unidades arbitrarias de luz emitida; se realizaron medidas repetidas durante 5 minutos en intervalos de 10 segundos y se realizó una media aritmética de dichas medias. A continuación se añadió ACh (10 μ M) y se midió la emisión de la luz durante 5 minutos. Posteriormente se añadió el Ácido 4,5-Dihidroxi-1,3-benceno-disulfónico (Tyron; 10 mM), permeable a la célula, secuestrador no-enzimático de los O_2^- y se midieron nuevamente los tubos para analizar la quimioluminiscencia dependiente de O_2^- . También se tomaron las medidas del medio en las mismas condiciones pero sin el segmento aórtico para así restar la emisión del fondo. Algunos experimentos se realizaron en presencia de SOD (13U/ml) para asegurar la especificidad del método. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias por miligramo de tejido por minuto (U.A/mg-min).

8.- Actividad SOD, PKG, PKA y PKC

Segmentos aórticos congelados procedentes de todos los grupos experimentales fueron homogenizados en 20 mM de HEPES, 1 mM de EGTA, 210 mM de manitol y 70 mM de sacarosa por gramo de tejido para determinar la actividad de SOD; en 0.2 mM de PMFS, 0.2 mM de Na_3VO_4 , 5 mM de β -mercaptoetanol, 150 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH7.4, 1 mM de EGTA, 1mM de EDTA y 2 mM de NaF para determinar la actividad de PKG; en 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 10 mM de benzamidina, 5 mM de EDTA, 10 mM de EGTA, 50 mM de b-mercaptoetanol, 1 mM PMSF para determinar las actividades de PKC y PKA.

Después se centrifugaron las muestras homogeneizadas a 15000 g durante 5 minutos, 5-10 μ l de sobrenadante fueron utilizados para el ensayo. La actividad de la enzima SOD fue medida utilizando el kit comercial SOD-706002 (Cayman Chemical); la actividad de PKG fue medida utilizando el kit comercial *CycLex® Cyclic GMP dependent protein Kinase Assay*; y las actividades de PKC y PKA

fueron analizadas con el kit comercial *Non radioactive protein kinase assay kit* (Calbiochem, Merk Chemicals) siguiendo, en todos los casos, las instrucciones del fabricante. Las fracciones solubles del homogenado (de las arterias del Kit de SOD, PKC y PKA) y las no solubles (de las arterias para el Kit PKG,) fueron también utilizadas para la cuantificación de proteína siguiendo el protocolo indicado en la preparación de la muestra del Western Blot, utilizando el Kit *DC protein assay* (BioRad) para medir las actividades de SOD y PKG y el *Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit* (BioRad) para PKA y PKC. En todos los casos se utilizó el lector de placas Multiskan AFCENT (Labsystems). Los resultados de la actividad de SOD están expresada en unidades arbitrarias/ml/mg proteína y los de la actividad de PKG, PKA y PKC en densidad óptica/ mg proteína.

9.- Formación de cGMP

Los segmentos de aorta procedentes de los animales jóvenes y viejos, control y ovariectomizados fueron sometidos a la tensión de 1g, como indicamos en los experimentos de reactividad vascular. Después de un periodo de estabilización de 60 minutos, los segmentos arteriales fueron precontraídos con NA (0.1 μ M) durante 3 minutos, posteriormente los segmentos fueron incubados con ACh (10 μ M) durante 15 segundos. Inmediatamente después los segmentos fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. Los niveles de cGMP fueron analizados utilizando el kit comercial, *Cyclic GMP Enzyme Immunoassay Kit* (Assay Desings). Para realizar el ensayo, los segmentos arteriales congelados fueron homogenizados en 0.1 M de HCl y centrifugados a 600g durante 10 minutos a 4 °C. Las fracciones no solubles de los homogenizados fueron utilizadas para medir el contenido proteico con un *DC protein Assay kit* (BioRad). Se recogieron los sobrenadantes y se utilizaron para el ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados están expresados en pmol cGMP/ mg proteína.

10.- Soluciones y fármacos

La composición de KHS fue: NaCl (115 mM), CaCl₂ (2,5 mM), KCl (4,6 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM), MgSO₄ · 7H₂O (1,2 mM), NaHCO₃ (25 mM), Glucosa (11,1 mM), Na₂EDTA (0,03 mM). La composición de la solución de HEPES fue: NaCl

(119 mM), HEPES (20 mM), CaCl_2 (1,2 mM), KH_2PO_4 (0,4 mM), MgSO_4 (1 mM), NaHCO_3 (5 mM), glucosa (5,5 mM), Na_2HPO_4 (0,15 mM).

Los fármacos utilizados fueron: L-NA hidrocloreídrico, ACh hidrocloreuro, NPS, L-NAME, ODQ, Tempol, KT-5823, Charibdotoxina, Glibenclamida, NS-1619, DAF-2, HE, lucigenina y tyron (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – USA). Las soluciones se prepararon con agua destilada, salvo la NA que se disolvió en NaCl (0,9%)-ácido ascórbico (0,01%), KT-5823 en ethyl acetato (5mg/ml), NS-1619 y Glibenclamida en dimetilsulfóxido (DMSO) y ODQ en etanol. Estas soluciones se guardaron a -20°C y se prepararon las diluciones apropiadas en solución KHS o HEPES en el mismo momento de realizar el experimento.

11.- Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como media \pm SEM (error estándar de la media).

En los experimentos de reactividad vascular, la relajación a ACh, NPS y NS-1619 se expresaron como porcentaje de la contracción inicial producida por NA. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GrphPad Prism Software (San Diego, CA, USA) comparando las curvas obtenidas en presencia de los diferentes fármacos con la curva control utilizando el test de análisis de la varianza (ANOVA, dos colas) considerando estadísticamente significativo los valores de $p < 0,05$. Algunos resultados se expresaron como porcentaje de las área bajo la curva (AUC) en situación control y experimental. Para ello, se calculó el AUC de cada curva individual en cada caso y la diferencia se expresó en porcentaje del AUC de la correspondiente situación control. La comparación de dichos valores se analizo mediante el test *t*-Student's para experimentos no-pareados utilizando el programa GrphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Para el resto de los experimentos (liberación de NO; producción de O_2^- , actividad de SOD, PKG, PKA y PKC; liberación de cGMP; los niveles séricos de estrona, progesterona y 17β -estradiol; y expresión de actina, eNOS, Cu/ZnSOD, subunidad α y β de los canales BK_{Ca} , subunidad Kir6.1 y SUR2B de los canales K_{ATP}), los resultados fueron analizados, utilizando el mismo programa, mediante el test *t*-Student's para experimentos no-pareados. En este caso también, valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativo.

Resultados y Discusión

EFFECTO DE LA OVARIECTOMÍA Y EL ENVEJECIMIENTO SOBRE:

1.- Peso corporal y uterino.

El envejecimiento aumentó en una 34% el peso de las ratas controles y de las ovariectomizadas y la ovariectomía aumentó en un 24% el peso de las ratas con respecto a sus controles (fase Estro) tanto a los 6 meses como a los 20 meses de edad (Tabla 6).

	Edad (meses)	Peso animal (gr)	Peso útero (gr)	Razón: Peso útero/Peso animal x 1000
Estro	6	302.3 ± 2.98 (25)	0.791 ± 0.05 (15)	2.617 ± 0.18 (15)
	20	405.0 ± 16.52 ^a (12)	0.908 ± 0.11 (10)	2.343 ± 0.34 (10)
OVX	6	374.9 ± 3.05 ^b (22)	0.111 ± 0.01 ^b (13)	0.298 ± 0.02 ^b (13)
	20	503.7 ± 79.00 ^{c,d} (10)	0.218 ± 0.03 ^{c,e} (10)	0.471 ± 0.08 ^{c,e} (10)

Tabla 6: Pesos de los animales y de los úteros. Los animales están divididos en cuatro grupos, animales control (fase Estro) de 6 ó 20 meses de edad y animales ovariectomizados (OVX) de 6 ó 20 meses de edad. Los valores están expresados como media ± SEM. (a) $p < 0.001$ frente a la situación control de 6 meses; (b) $p < 0.0001$ frente a la situación control de 6 meses; (c) $p < 0.0001$, frente a la situación control de 20 meses; (d) $p < 0.0001$, frente a la situación OVX de 6 meses; (e) $p < 0.05$, frente a la situación OVX de 6 meses. El número de animales está expresado entre paréntesis en cada casilla.

Está descrito que el envejecimiento está asociado a cambios y alteraciones en el metabolismo y constitución corporal (Castillo *et al*, 2003) lo que concuerda con nuestros resultados. Epidemiológicamente, en mujeres, este proceso se ve acelerado tras la menopausia (Heymsfield *et al*, 1994), sin embargo, en nuestro modelo experimental el incremento de peso provocado por el envejecimiento coincide en situación control y en ratas ovariectomizadas quirúrgicamente.

Se ha descrito que en animales ovariectomizados se produce alteraciones en el balance de energía y en el metabolismo lipídico (Teede *et al*, 2001; Lemieux *et al*, 2003; Choi *et al*, 2005; Ferrer *et al*, 1996) incrementándose el consumo diario de energía, la masa corporal y la masa grasa (Latour *et al*, 2001; Richard *et al*, 1987) lo que explicaría el aumento de peso en los animales ovariectomizados, tanto a los 6 meses de edad, como a los 20 meses.

El peso del útero es considerado como un parámetro dependiente de la actividad de los receptores estrogénicos (Castillo *et al*, 2005; Wight *et al*, 2000^b).

La ovariectomía disminuyó significativamente el peso uterino tanto a los 6 meses, como a los 20 meses de edad, sin embargo, el envejecimiento no modificó su peso (Tabla 6). Estas diferencias se mantienen al normalizar los datos con el peso del animal. Estos resultados coinciden con otros investigadores, quienes han descrito que en hembras jóvenes ovariectomizadas, la administración exógena de estrógenos incrementa el peso uterino (Sibonga *et al*, 2003) y se ha demostrado que la ovariectomía en animales viejos produce una disminución del mismo en comparación con animales intactos (Castillo *et al*, 2005).

Estos resultados indican que la intervención quirúrgica se ha realizado satisfactoriamente y que los cambios que obtengamos a continuación se pueden considerar que vienen provocados por la ausencia de ovarios funcionales. Puesto que los estrógenos y la progesterona tienen efectos importantes sobre el útero, controlando los mecanismos de proliferación y diferenciación celular (Castillo *et al*, 2005; Wight *et al*, 2000^b) a continuación analizamos los niveles séricos de progesterona, estrona, testosterona y 17 β -estradiol.

2.- Niveles séricos de hormonas progesterona, estrona, 17 β -estradiol y testosterona

Los niveles de las hormonas sexuales, analizados en suero sanguíneo de los cuatro grupos experimentales, muestran la existencia de grandes diferencias entre todos los grupos (Tabla 7).

a) Diferencias de los niveles séricos de hormonas sexuales en el envejecimiento

Con el envejecimiento, en ratas control, los niveles séricos de la progesterona, estrona, 17 β -estradiol y testosterona están disminuidos (71%, 41%, 63%, 66% respectivamente).

	Edad (meses)	Progesterona (ng/ml) N=6	Estrona (pg/ml) N=6	17 β -estradiol (pg/ml) N=12	Testosterona (pg/ml) N=6
Estro	6	47.18 \pm 8.94	394.1 \pm 63.02	466.3 \pm 48.9	321.3 \pm 84.2
	20	13.45 \pm 4.69 ^a	232.8 \pm 48.98 ^a	174.2 \pm 45.5 ^b	109.0 \pm 3.51 ^a
OVX	6	0.98 \pm 0.23 ^c	118.2 \pm 27.23 ^d	269.8 \pm 56.3 ^d	55.40 \pm 13.8 ^d
	20	3.62 \pm 1.02 ^e	285.7 \pm 36.76	174.8 \pm 47.6	101.4 \pm 38.7

Tabla 7: Nivel séricos de progesterona, estrona, 17 β -estradiol y testosterona endógenas de los animales control (fase Estro) de 6 ó 20 meses de edad y animales ovariectomizados (OVX) de 6 ó 20 meses de edad. Los datos están expresados como media \pm SEM, el numero de datos viene indicado en la N. (a) $p < 0.05$ frente a la situación Estro 6 meses; (b) $p < 0.01$ frente a la situación Estro 6 meses; (c) $p < 0.0001$ frente a la situación Estro 6 meses; (d) $p < 0.05$ frente a la situación Estro 6 meses; (e) $p < 0.05$ frente a la situación Estro 20 meses.

Es ampliamente conocido que el envejecimiento va acompañado de la disminución de los niveles de hormonas sexuales (Stice *et al*, 2009), lo cual concuerda con nuestro resultados. Sin embargo, también ha sido descrito que los niveles de 17 β -estradiol no están modificados por el envejecimiento en el suero sanguíneo de ratas (Tschudi *et al*, 1996; Hashimoto *et al*, 1998).

El envejecimiento en ovariectomizadas incrementa los niveles de progesterona y estrona (270% y 142%, respectivamente) y no modifica los niveles de 17 β -estradiol y testosterona aunque existe una tendencia a modificarlos. El hecho de que en ovariectomizadas el envejecimiento incremente los niveles séricos de progesterona y estrona, nos indica que con el envejecimiento se han desarrollado nuevas fuentes precursoras de hormonas sexuales, como puede ser el exceso de grasa que encontramos en ovariectomizadas de 20 meses de edad. Se ha descrito que el tejido graso es una fuente importante de hormonas esteroideas, ya que actúan las enzimas aromatasa y 17 β -HSD (Deslypere *et al*, 1985). En este sentido, también está descrito que la corteza suprarrenal posee un importante papel en la síntesis de hormonas sexuales en situaciones donde la función ovárica está disminuida (Watanobe y Yoneda, 2003).

b) Diferencias de los niveles séricos de las hormonas sexuales provocados por ovariectomía.

La ovariectomía en animales jóvenes disminuyó los niveles séricos de progesterona, estrona, 17β -estradiol y testosterona (98%, 67%, 42% y 83%, respectivamente).

Sin embargo, la ovariectomía en animales viejos sólo disminuyó en un 73% los niveles de progesterona en el suero sanguíneo.

Sorprendentemente los niveles de 17β -estradiol parecen demasiado elevados tras una ovariectomía efectiva, sin embargo en determinados experimentos de larga duración con animales ovariectomizados se detectaron niveles significativos de estrógenos en sangre, sugiriendo que algunos órganos como las glándulas suprarrenales pueden contribuir a la secreción de éstos (Shinoda *et al*, 2002).

Así mismo, al encontrar en nuestros datos una disminución considerable en los niveles de estrona y testosterona en las ratas ovariectomizadas jóvenes, es de suponer que los niveles de 17β -estradiol también estén disminuidos, pues tanto sus precursores/productos estrona y testosterona lo están y dado que las reacciones son a su vez reversibles, apoya la hipótesis de que los niveles de 17β -estradiol estén disminuidos (Figura 19).

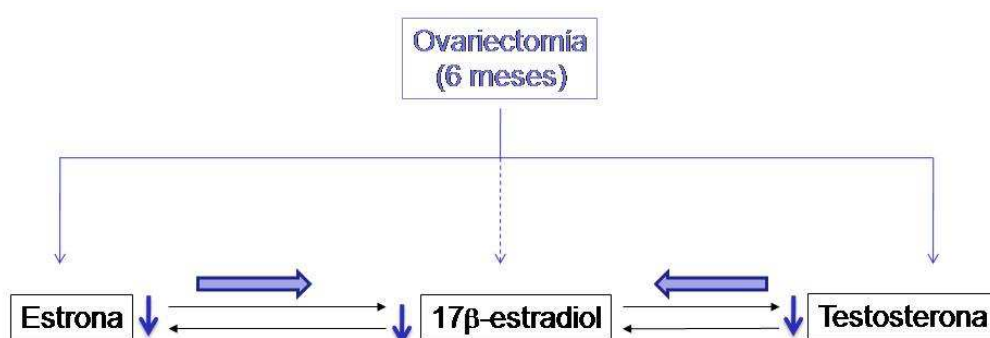


Figura 19: Efecto de la ovariectomía en los niveles de estrona, 17β -estradiol y testosterona en ratas hembras de 6 meses de edad.

Está descrito que en animales viejos la ovariectomía no modifica los niveles 17β -estradiol (Castillo *et al*, 2005; Persky *et al*, 2000; Wight *et al*, 2000^b) por lo que no observar modificación en los niveles de estrona y testosterona también

estaría de acuerdo, pues las tres moléculas se encontrarían en equilibrio (Figura 20).

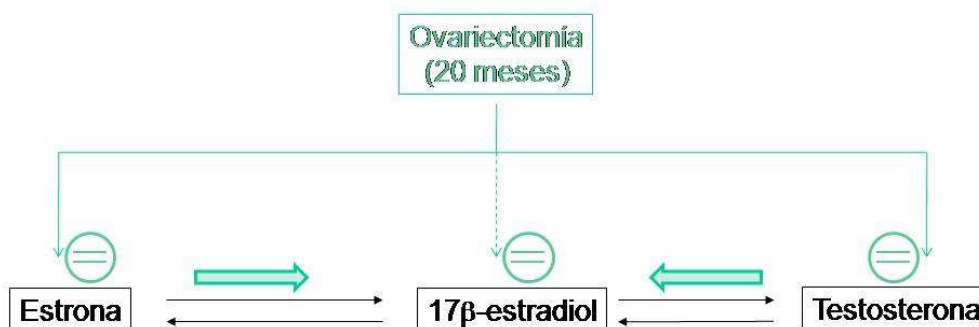


Figura 20: Efecto de la ovariectomía en los niveles de estrona, 17 β -estradiol y testosterona en ratas hembras de 20 meses de edad.

Al coincidir los valores en animales control y ovariectomizados viejos se podría hipotetizar que el origen de estos niveles séricos de estrona, testosterona y 17β -estradiol es adrenal y/o graso, como han citado otros investigadores (Maroulis y Abraham, 1976; Vermeulen, 1976).

3.- Presión arterial

La ovariectomía en jóvenes y el envejecimiento en ratas control no modificaron las presiones arteriales, de acuerdo con lo publicado anteriormente (Conrad *et al*, 1994; Ferrer y Osol, 1998). Sin embargo, en ratas viejas la ovariectomía aumentó la presión arterial significativamente (Tabla 8).

	Edad (meses)	Presión Arterial (mm Hg)	Número de animales
Estro	6	127.8 ± 4.3	8
	20	136.5 ± 4.1	8
OVX	6	132.5 ± 8.3	8
	20	151.1 ± 2.9 *	7

Tabla 8. Presión arterial de los animales control (fase Estro) de 6 ó 20 meses de edad y animales ovariectomizados (OVX) de 6 ó 20 meses de edad. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$ frente a la situación control de 20 meses de edad.

Por tanto, los resultados obtenidos en nuestro estudio son derivados de la pérdida de ovarios funcionales y no van acompañados de cambios hemodinámicos, salvo en ovariectomizadas viejas donde se desarrolla una leve

hipertensión. Estos resultados ponen de manifiesto que el mantenimiento de una función ovárica previene la aparición de hipertensión en el envejecimiento, y en este efecto participan otros factores adicionales al 17β -estradiol puesto que los niveles del 17β -estradiol no varían entre ratas control viejas y ovariectomizadas. En esta línea, se ha descrito una relación entre los niveles de progesterona endógena y la función vascular en mujeres postmenopáusicas (Szmuiłowicz *et al*, 2007). Aunque, no está todavía claro los efectos concretos de la progesterona endógena en el envejecimiento, parecen tener gran importancia puesto que los niveles de otras hormonas sexuales como la estrona, 17β -estradiol y testosterona, no están modificados.

4.- Contenido de actina

El análisis de Western Blot de la actina (isoformas α y β) de todos los grupos experimentales, nos muestra que la ovariectomía mantenida hasta los 6 meses de edad no produce modificación ni en la expresión de la actina (Figura 21).

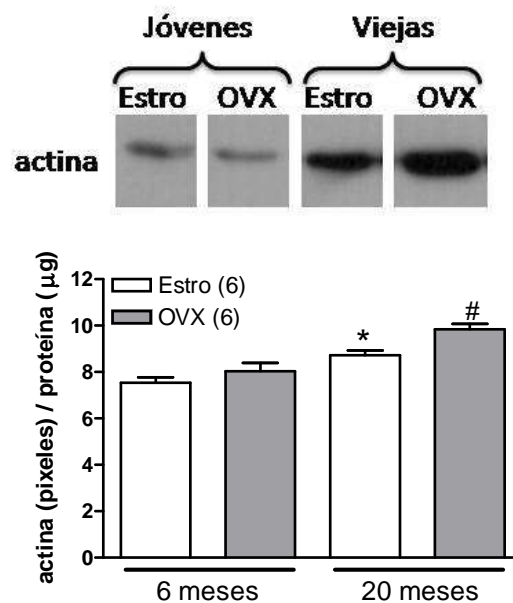


Figura 21: Western Blot representativo para la expresión de actina en segmentos de aorta de ratas hembras control (fase Estro) y ovariectomizadas de 6 y 20 meses (A). El panel B muestra el análisis densitométrico de la expresión de actina. Los resultados (medias \pm SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para actina (píxeles) y la concentración de proteína cargada (20 μ g). El número de animales se muestra entre paréntesis. * $p < 0.001$ frente a la situación estro 6 meses; # $p < 0.01$ frente a la situación estro 20 meses.

Sin embargo, la expresión de actina está incrementada por el envejecimiento en aortas de animales control (Figura 21), pero dicha modificación no está

acompañada de cambios hemodinámicos. Adicionalmente, la ovariectomía mantenida hasta los 20 meses, provoca un incremento de la expresión de actina (Figura 21), pudiendo ser ésta una de las causas por la que encontramos una leve hipertensión en este grupo experimental.

Se ha descrito que el envejecimiento incrementa el grosor de la pared arterial (Spinetti *et al* 2004). Sin embargo, a pesar de las diferencias provocadas por el envejecimiento en cuanto a expresión de la actina, no se observan cambios funcionales en las respuestas contráctiles inducidas por KCl (75 mM) y NA (0.1 μ M) en los segmentos de aorta de los animales controles jóvenes y viejas (Tabla 9).

	Edad (meses)	KCl (mg contracción)	NA (mg contracción)	Número de animales
ESTRO	6	1329 \pm 65.8	910 \pm 36.9	20
	20	1342 \pm 73.21	982 \pm 94.2	34
OVX	6	1472 \pm 63.48	1005 \pm 48.4	22
	20	1504 \pm 124.9	1084 \pm 66.9	20

Tabla 9: Respuestas contráctiles inducidas por 75 mM de KCl y 0.1 μ M de Noradrenalina (NA) de los animales control (fase Estro) de 6 ó 20 meses de edad y animales ovariectomizados (OVX) de 6 ó 20 meses de edad. Los datos están expresados como media \pm SEM.

Existe controversia en este punto, pues se ha descrito un incremento en la contracción a KCl tanto en ratas ovariectomizadas jóvenes (Paul *et al*, 2007) como en ratas tratadas con estradiol (Aikawa *et al*, 2003), pero también se ha descrito que la ovariectomía no provoca modificación en la respuesta contráctil a KCl en mesentérica (Minoves *et al*, 2002) y aorta (Tejera *et al*, 1999) de rata. En cuanto a la respuesta contráctil inducida por NA, se ha descrito que bajas dosis de 17 β -estradiol y/o progesterona no modifican la sensibilidad a NA y que altas dosis de 17 β -estradiol incrementa la sensibilidad a NA en aorta de ratas ovariectomizadas, la cual se previene con progesterona (Moura y Marcondes, 2001). Estos datos respaldan nuestros resultados, ya que en nuestras condiciones experimentales los niveles de hormonas sexuales que participan en la respuesta contráctil a NA son los fisiológicos.

Adicionalmente, se ha descrito que la ovariectomía modifica la respuesta contráctil inducida por NA (Zamorano *et al*, 1995). Esta discrepancia sobre los

datos puede ser debida a la variabilidad de tiempo que se mantiene la ovariectomía, ya que en la mayoría de los estudios realizados con animales ovariectomizados, los períodos de mantenimiento son muy cortos (días ó 1-2 meses), pero en nuestro modelo experimental son de 5 meses en hembras jóvenes y 19 meses en viejas. Así mismo, se han publicado estudios en los que el tratamiento con hormonas sexuales incrementa el número y densidad de canales de Ca^{2+} (Rendt *et al*, 1992) o produce un efecto hipertrófico muscular aumentando la función contráctil (Aikawa *et al*, 2003), por lo que los resultados obtenidos pueden variar en función de los modelos y condiciones experimentales utilizados.

Respecto al envejecimiento, observamos que no se producen cambios en las respuestas contráctiles a KCl, ni a NA. En este sentido, también existen datos contradictorios, ya que el envejecimiento disminuye (Lang *et al*, 1995; Ponte *et al.*, 1996; Blough *et al*, 2007) o incrementa (Lang *et al.*, 1995) la respuesta inducida por KCl. Así mismo también se han descrito modificaciones en la respuesta contráctil mediada por NA (Marín y Rodríguez-Martínez, 1999).

El mantenimiento de las respuestas contráctiles puede deberse a que los cambios en el contenido de actina, más los hemodinámicos en ovariectomizadas viejas, puedan ir acompañados de otras alteraciones en distintos mecanismos de señalización, que mantengan la función vasomotora.

A continuación se analizará las posibles alteraciones en la respuesta vasodilatadora provocadas por el envejecimiento y ovariectomía.

EFECTO DE LA OVARIECTOMÍA EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR EN ANIMALES JÓVENES

1.- Respuesta a ACh

La respuesta vasodilatadora a ACh exógena fue similar en hembras controles y en ovariectomizadas (Figura 34).

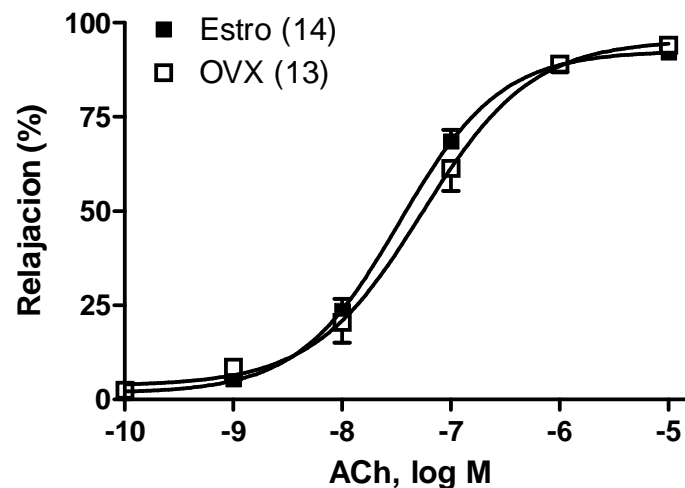


Figura 34: Efecto vasodilatador de ACh (0.1 nM- 10 μ M) en aorta de ratas hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (medias \pm SEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1002 ± 41.74 mg, N=14; OVX: 1115 ± 93.11 mg, N=13). El número de datos está entre paréntesis.

Este resultado concuerda con lo descrito en otras publicaciones (Martorell *et al*, 2009; Zhou *et al*, 2005, Tejera *et al*, 1999) y difiere de lo publicado por otros grupos de investigación dónde la ovariectomía reducía la relajación a ACh en aorta de rata (Lam *et al*, 2006; Figar *et al*, 2006, Cheng *et al*, 1994) o en femoral de conejo (Gisclard *et al*, 1998). Estas diferencias pueden ser debidas a la edad, cepa del animal o al tratamiento con hormonas sexuales.

Esta heterogeneidad en los efectos de las hormonas sexuales sobre la modulación de la relajación dependiente de endotelio puede reflejar cambios en la liberación y/o función de los distintos factores endoteliales, dependiendo del lecho estudiado y condiciones experimentales.

No se puede descartar que las hormonas sexuales femeninas modulen la participación del NO en dicha respuesta aunque la ovariectomía no modifique la respuesta a ACh, por lo que será analizado a continuación.

2.- Participación del NO endotelial

2.1.- Participación del NO endotelial en respuesta a ACh

Con el fin de analizar la implicación del NO endotelial en la respuesta a ACh en aorta de hembras jóvenes control y ovariectomizadas se incubaron con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME. La preincubación con L-NAME (0,1 mM) disminuyó parcialmente la respuesta a ACh en aortas de ambos grupos (Figura 35), indicando la participación del NO y otros factores adicionales con papel funcional en la respuesta vasodilatadora a ACh. Adicionalmente, se observa que en las aortas de hembras ovariectomizadas la incubación con L-NAME redujo en menor medida la respuesta a ACh (Figura 36).

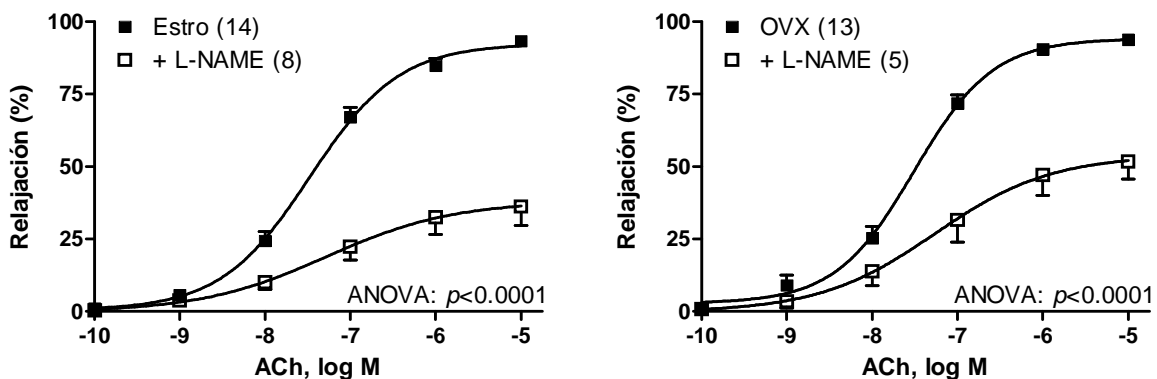


Figura 35. Efecto de L-NAME (0,1 mM) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1002 \pm 41.74 mg, N=14; Estro + L-NAME 1247 \pm 95.10 mg, N=8; OVX: 1115 \pm 93.11 mg, N=13; OVX + L-NAME 906 \pm 54 mg, N=5). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

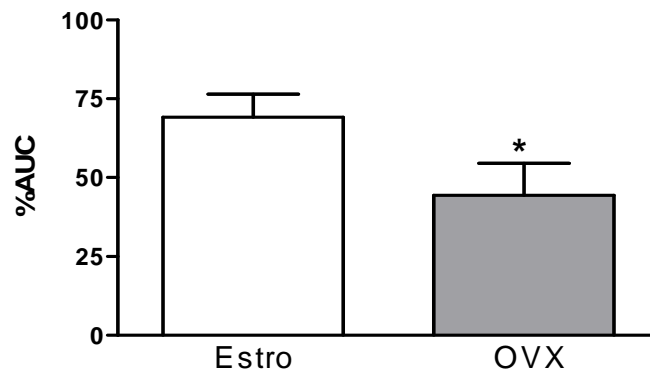


Figura 36: Diferencias del área bajo la curva (AUC) a ACh en segmentos de aorta de hembras control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) jóvenes, precontraídos con 0.1 μ M NA en ausencia o presencia de L-NAME (0.1 mM). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como el porcentaje del AUC en arterias control. * p <0.05 comparando ambos grupos.

Sabemos, por otros trabajos realizados en nuestro laboratorio que la ovariectomía incrementa la expresión de COX-2 e induce un desequilibrio en la producción de prostanoïdes vasoconstrictores y vasodilatadores, siendo los prostanoïdes vasoconstrictores los predominantes. Sin embargo, existe un mecanismo compensatorio, que consiste en una regulación positiva de la liberación de NO endotelial por los derivados de COX-2 (Martorell *et al*, 2009). De la misma manera, no podemos descartar la posibilidad de que al incubarse con L-NAME se produzcan modificaciones en la regulación de dichos prostanoïdes en respuesta a la ACh.

Adicionalmente, la incubación con L-NAME incrementó la precontracción a NA (0.1 μ M) en los segmentos aórticos procedentes de animales control jóvenes (Estro joven: 1002 ± 41.74 mg, N=14; Estro joven + L-NAME 1247 ± 95.10 mg, N=8, $p < 0.05$), como ya había sido descrito (Zonta *et al*, 1998; Calderone *et al*, 2002; Bechara *et al*, 2008). Sin embargo, la incubación con L-NAME no modificó la respuesta contráctil a la dosis única de NA en los segmentos aórticos procedentes de ratas jóvenes ovariectomizadas (OVX: 1115 ± 93.11 mg, N=13; OVX + L-NAME 906 ± 54 mg, N=5, $p = 0.20$), lo cual nos indica que el NO modula negativamente la respuesta contráctil a NA sólo en aortas de ratas control y no participa en las aortas de ratas ovariectomizadas como ha sido descrito (Calderone *et al*, 2002).

En cualquier caso, en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh en los segmentos aórticos precontraídos con NA, la participación del NO, al margen de otros factores, es la resultante de su liberación y su efecto vasomotor. Por tanto, estos aspectos serán analizados a continuación.

2.2.- Reactividad vascular a NPS

La vasodilatación inducida por NPS no se vio modificada por la ovariectomía, indicando que la disfunción ovárica no altera la sensibilidad del músculo liso vascular al donante de NO como ya había sido publicado en aorta de rata (Yamaguchi *et al*, 2001; Conde *et al*, 2000) (Figura 37).

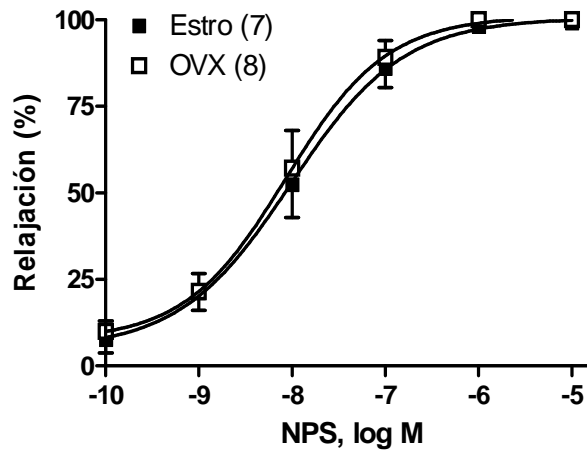


Figura 37: Efecto vasodilatador de NPS en aorta de ratas hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (medias \pm SEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 989 ± 120.5 mg, N=7; OVX: 1125 ± 133.4 mg, N=8). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

2.3.- Expresión de eNOS y liberación de NO endotelial

Teniendo en cuenta que la participación del NO endotelial inducida por ACh parece mayor en hembras controles y sin embargo la sensibilidad del músculo liso al NO no varía, se analizó la expresión de eNOS. Los resultados mostraron que la ovariectomía no modificó la expresión de dicha enzima (Figura 38).

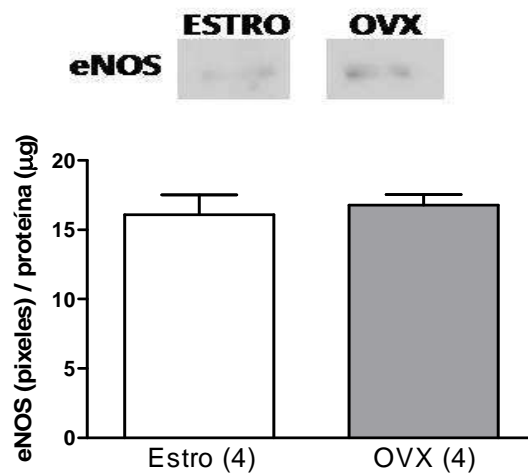


Figura 38: Resultados del análisis de la expresión de eNOS mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de eNOS. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de eNOS de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para eNOS (píxeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 μ g).

Ya había sido descrito que la ovariectomía no modifica la expresión de eNOS en células endoteliales de aorta (Wang *et al*, 1997; Martorell *et al*, 2009). Sin embargo, existen resultados contradictorios con respecto a la regulación de la expresión de la eNOS por las hormonas sexuales. Se ha descrito que los estrógenos no modifican (Nawate *et al*, 2005) e incrementan (Hishikawa *et al*, 1995; Gonzales *et al*, 2001) la expresión de la eNOS a través de distintos mecanismos que incluyen el incremento de Ca^{2+} en la célula endotelial (Weiner *et al*, 1994).

Adicionalmente, se ha descrito que la progesterona incrementa la expresión de eNOS (Rupnow *et al*, 2001), pero existe discrepancia en su papel sobre la actividad de la eNOS, pues se ha descrito que no participa (Weiner y Thompson, 1997) y que incrementa (Zhang *et al*, 2002) la actividad de eNOS. Por lo tanto, la regulación de la expresión de eNOS por las hormonas sexuales es controvertida y difiere del lecho estudiado, cepa del animal y al posible tratamiento hormonal aplicado.

Como ha sido descrito que el 17β -estradiol (Wang *et al*, 2000; Nie *et al*, 2001), la progesterona (Zhang *et al*, 2002; Mendiberri *et al*, 2006) y la estrona (Selles *et al*, 2005; Rauschemberg *et al*, 2008) estimulan la liberación de NO y puesto que la ovariectomía reduce las concentraciones séricas de dichas hormonas, se analizó la liberación de NO en aorta de ratas jóvenes control y ovariectomizadas.

Los resultados mostraron que la ovariectomía no produjo cambios en la liberación basal ni en la estimulada por ACh (Figura 39) como ya ha sido publicado (Martorell *et al*, 2009).

Estos resultados concuerdan con otras publicaciones en las que muestran que el tratamiento de ratas ovariectomizadas con hormonas sexuales femeninas no incrementa la liberación de NO en aorta de rata (Vedernikov *et al*, 1997). Sin embargo, otros estudios ponen de manifiesto la existencia de una regulación hormonal sobre la liberación de NO, donde se ve disminuidos los niveles séricos de NO en animales ovariectomizados (Wang *et al*, 1997). Estudios realizados en arteria coronaria ponen de manifiesto que los niveles plasmáticos de 17β -estradiol regulan la liberación basal de NO endotelial, los cuales disminuyen en las células endoteliales procedentes de animales ovariectomizados (Wellman *et al*, 1996).

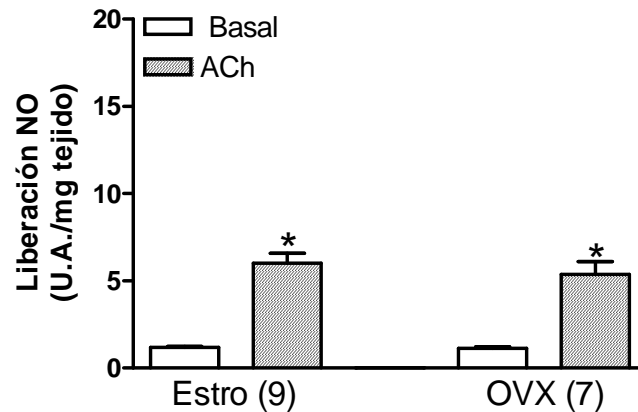


Figura 39: Liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh en segmentos procedentes de animales jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizados (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados (media \pm SEM) se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. * $p < 0,05$ frente a la liberación basal de NO.

La mayoría de los estudios realizados analizan el efecto de la administración exógena de hormonas sexuales sobre animales ovariectomizados durante cortos períodos de tiempo. En este sentido Ferrer y Osol (1998) observaron que la ovariectomía, mantenida durante 21 días, abolía la participación del NO endotelial en respuesta al agonista α , clonidina, y que el tratamiento con 17 β -estradiol incrementaba dicha participación. Por lo tanto, el lecho vascular analizado, el momento y duración de la ovariectomía, y la utilización o no de terapia sustitutiva son elementos importantes para explicar los resultados y pueden ser la causa de la existencia de controversia sobre el efecto vascular de las hormonas sexuales.

Puesto que la ovariectomía no modificó la expresión de la eNOS, ni la liberación de NO, se podría hipotetizar que la actividad de la enzima no se ve alterada por la pérdida de función ovárica como ha sido descrito (Barber y Miller, 1997; Riveiro *et al*, 2001). Sin embargo, existen publicaciones que muestran que los estrógenos incrementan la actividad de la eNOS (Weiner *et al*, 1994; Wellmann *et al*, 1996; Meyer *et al*, 1997) y de la concentración intracelular de Ca^{2+} (Hishikawa *et al*, 1995; Hayashi *et al*, 1992). Esta variabilidad de los efectos del estradiol en las respuestas vasculares puede ser debido a las distintas especies estudiadas, la concentración y duración del tratamiento con estrógenos, y/o del lecho vascular estudiado.

2.4.- Niveles de cGMP

Sabiendo que en nuestro modelo experimental, la ovariectomía no parece alterar la expresión y actividad de la eNOS, pero viendo que en la respuesta a ACh el NO tiene distinta participación, el siguiente paso fue analizar la liberación de cGMP.

La liberación basal del cGMP no se modificó por la ovariectomía en los segmentos de ratas jóvenes, sin embargo el incremento provocado tras la estimulación con ACh fue mucho mayor en animales controles que en ovariectomizados (Figura 40).

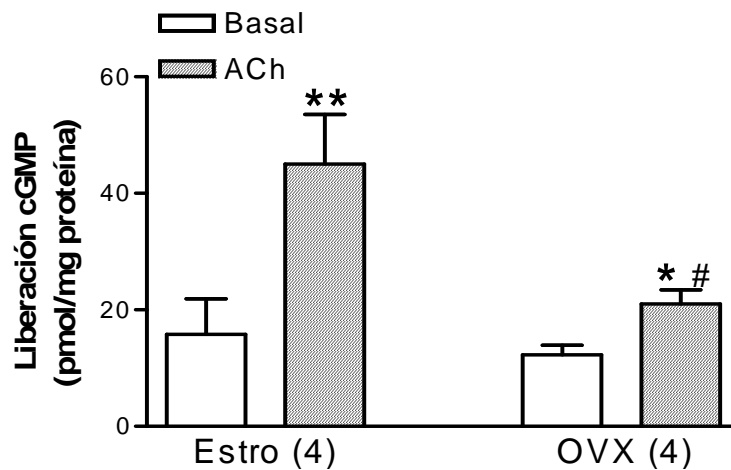


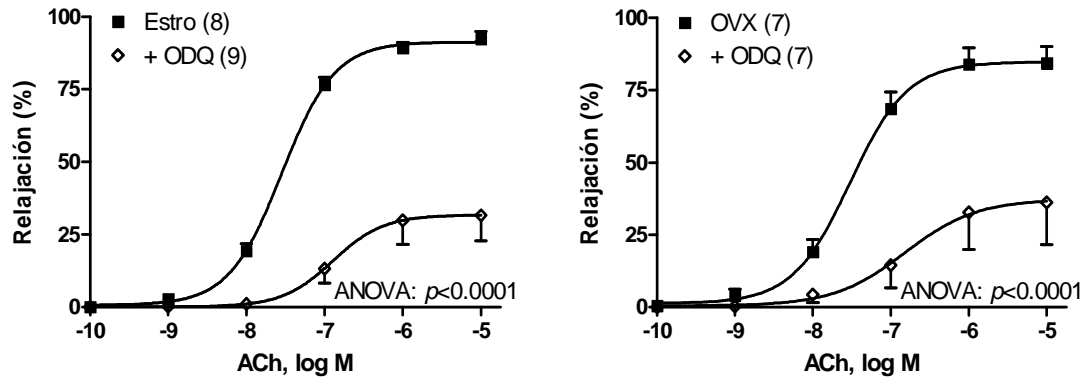
Figura 40: Liberación de cGMP basal y estimulada por ACh en segmentos procedentes de animales jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizados (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados (media \pm SEM) se expresaron como pmol/mg de tejido. * $p < 0,05$; ** $p < 0.001$ frente a la liberación basal de cGMP, # $p < 0.05$ frente a la situación control estimulada con ACh.

Este resultado están de acuerdo con el incremento de actividad de la sGC producido por los estrógenos (Gorodeski 2000; Russell *et al*, 2000) y justifica la menor participación del NO en la respuesta a ACh en los segmentos procedentes de animales jóvenes ovariectomizados.

El siguiente paso fue analizar la participación funcional de la guanilato ciclasa en respuesta a ACh.

2.5.- Participación del sGC en respuesta a ACh

Para ello se incubaron los segmentos de aorta procedentes de animales jóvenes controles y ovariectomizados con el inhibidor específico de la sGC, ODQ. La preincubación con ODQ (10 μ M), disminuyó la respuesta a ACh en ratas control y ovariectomizadas (Figura 41).



Fig

Figura 41. Efecto del ODQ (10 μ M) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1071 \pm 82.17 mg, N= 8; Estro + ODQ: 2127 \pm 113.0 mg, N=9; OVX: 1452 \pm 99.45 mg, N=7; OVX + ODQ: 2566 \pm 199.5 mg, N=7). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

Con el análisis del área bajo la curva (AUC), se observa que el papel inhibitorio del ODQ en la respuesta vasodilatadora a ACh es igual en ambos casos (Figura 42).

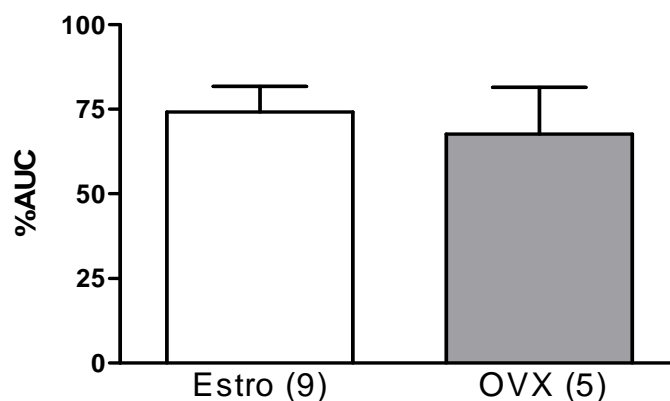


Figura 42: Diferencias del área bajo la curva (AUC) a ACh en segmentos de aorta de hembras control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) jóvenes, precontraídos con 0.1 μ M NA en ausencia o presencia de ODQ (10 μ M). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como el porcentaje del AUC en arterias control.

Con estos resultados, junto con los anteriores, observamos que en las aortas procedentes de animales control el grado de inhibición producido por el ODQ sobre la respuesta vasodilatadora inducida por ACh es similar al grado de inhibición producido por el L-NAME (ESTRO+ODQ: 74.22 ± 7.54 %AUC, N=9; ESTRO+L-NAME: 69.20 ± 7.30 %AUC, N=10, $p=0.64$), mientras que en las aortas de animales ovariectomizados observamos que la inhibición de la sGC con ODQ tiene mayor papel funcional que la inhibición de la síntesis del NO con L-NAME (OVX+ODQ: 69.7 ± 9.74 %AUC, N=5; OVX+L-NAME: 44.4 ± 9.18 %AUC, N=5, $p<0.05$). Estos resultados, junto con la menor actividad de la sGC en ratas ovariectomizadas, sugieren que la ovariectomía provoque una regulación complementaria sobre la sGC, que no dependa (al menos directamente) del NO.

Adicionalmente, la incubación con ODQ modificó la precontracción con NA en los segmentos aórticos procedentes de animales control (Estro: 1071 ± 82.17 mg, N= 8; Estro + ODQ: 2127 ± 113.0 mg, N=9, $p<0.001$) y ovariectomizados (OVX: 1452 ± 99.45 mg, N=7; OVX + ODQ: 2566 ± 199.5 mg, N=7, $p<0.001$) dando a entender que la sGC regula negativamente la respuesta contráctil inducida por NA. Este resultado concuerda con el incremento de la respuesta contráctil a la dosis única de NA obtenido en las ratas control al inhibir la síntesis de NO con L-NAME (Bechara *et al*, 2008) y apoya a la respuesta obtenida con el ODQ en la relajación inducida por ACh, donde se aprecia la existencia de otros factores, diferentes al NO, que mediante su acción sobre la sGC regulan negativamente la contracción a NA y positivamente la relajación a ACh.

3.- Aniones superóxido

La función vascular de NO endotelial depende de su biodisponibilidad, es decir del balance entre su producción y su degradación. Las especies reactivas de oxígeno participan en el metabolismo del NO (Gryglewski *et al*, 1986; Ferrer *et al*, 2000), y, en concreto, los O_2^- son cruciales en este proceso (Beckman y Koppenol, 1996).

3.1.- Localización *in situ* de aniones superóxido

La ovariectomía en hembras jóvenes provocó un incremento en la producción de O_2^- (Figura 43). Resultados similares se obtuvieron midiendo la quimioluminiscencia emitida por lucigenina (Estro: 63.2 ± 7.1 U/mg/min, N=4; OVX: 345.3 ± 5.9 U/mg/min, N=6, $p < 0.001$).

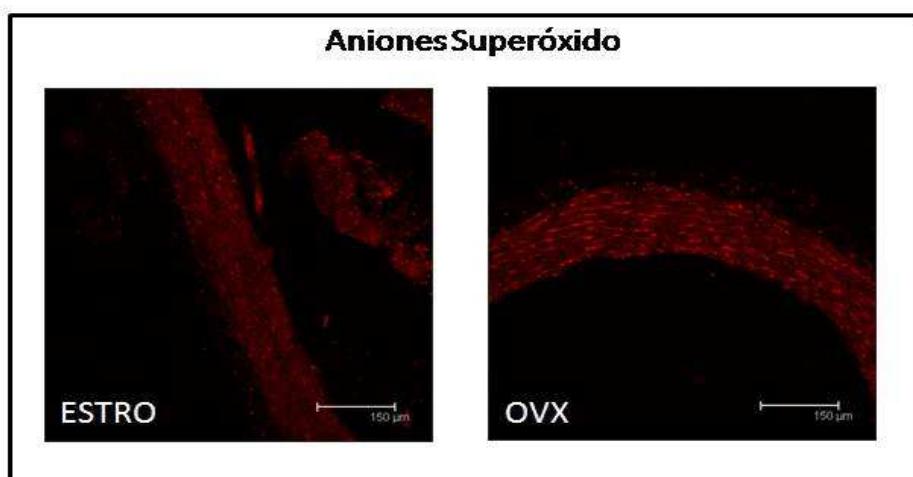


Figura 43. Detección *in situ* de aniones superóxido mediante microscopía confocal en segmentos aórticos procedentes de animales control (fase Estro) y ovariectomizados (OVX). La figura es una imagen representativa de una sección arterial de cuatro segmentos de cada grupo magnificada 200x.

Esto está de acuerdo con el papel antioxidante descrito para las hormonas sexuales (Ayres *et al*, 1998; Ghanam *et al* 1998). Es importante mencionar que los niveles que detectamos de O_2^- *in situ*, son el resultado de la producción y eliminación de los mismos. La eliminación de los O_2^- esta mediada fundamentalmente por la enzima SOD, cuya expresión y actividad se analizaran a continuación.

3.2.- Expresión Cu/ZnSOD y MnSOD. Actividad de SOD

Existen tres isoformas de SOD (Fukai *et al*, 2000) en aorta de rata, como ya ha sido mencionado en la introducción (Apartado 3.2.1.): Cu/ZnSOD, MnSOD, ecSOD. Sin embargo los niveles vasculares de ecSOD en rata son muy bajos (Marklund, 2002) por lo que analizaremos la expresión de Cu/ZnSOD y la MnSOD (descrita como la isoforma más activa en la eliminación de ROS en la mitocondrias).

Observamos que la ovariectomía en hembras, no modificó la expresión de Cu/ZnSOD, sin embargo produjo un incremento en la expresión de MnSOD (Figura 44).

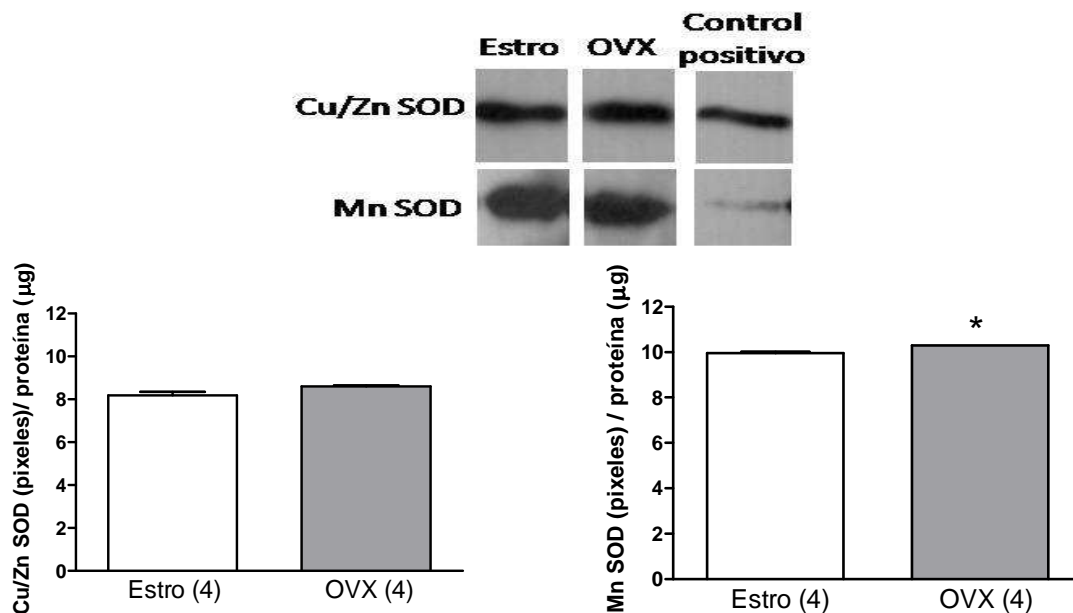


Figura 44: Resultados del análisis de la expresión de Cu/ZnSOD y MnSOD mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de Cu/ZnSOD y MnSOD. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de Cu/ZnSOD (izquierda) y MnSOD (derecha) de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para Cu/ZnSOD y MnSOD (pixeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 μg).* $p < 0.01$ frente a la situación control.

Así mismo, la ovariectomía incrementó la actividad de SOD (Figura 45).

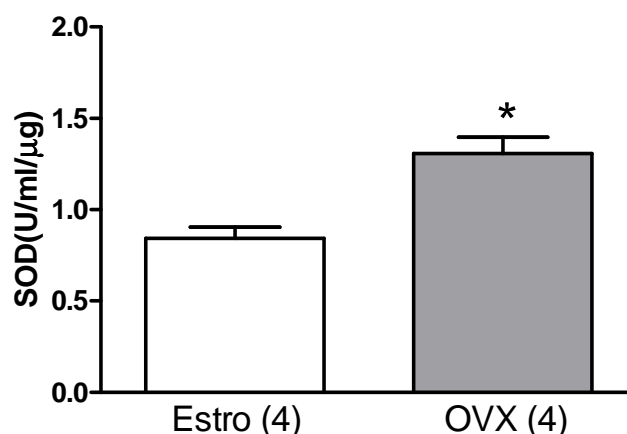


Figura 45: Actividad de la SOD en segmentos de aorta procedentes de animales control (fase Estro) y ovariectomizados (OVX). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como unidades de SOD/ml por mg de proteína. El número de animales está indicado entre paréntesis. * $p < 0.01$ frente a las ratas control.

Se ha descrito un incremento en la expresión y/o actividad de la SOD en diferentes situaciones fisiopatológicas en los que existe una superproducción de O_2^- (Kobayashi *et al*, 2002; Tanaka *et al*, 2005; Blanco-Rivero *et al*, 2006). El hecho de que la actividad de la SOD esté incrementada en ovariectomizadas jóvenes podría considerarse como un mecanismo compensatorio para eliminar la elevada formación de O_2^- .

3.3.- Papel de los aniones superóxido en la respuesta a ACh

Para estudiar el papel funcional de los O_2^- en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, se incubaron los segmentos procedentes de ratas hembras jóvenes control y ovariectomizadas con el mimético permeable de la SOD, tempol (0.1 mM), 30 minutos antes de realizar la curva concentración-respuesta a ACh en los segmentos precontraídos con 0.1 μ M NA.

Tanto en aorta de ratas control, como en las ovariectomizadas, el tempol (0.1 mM) produjo una disminución en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, (Figura 46).

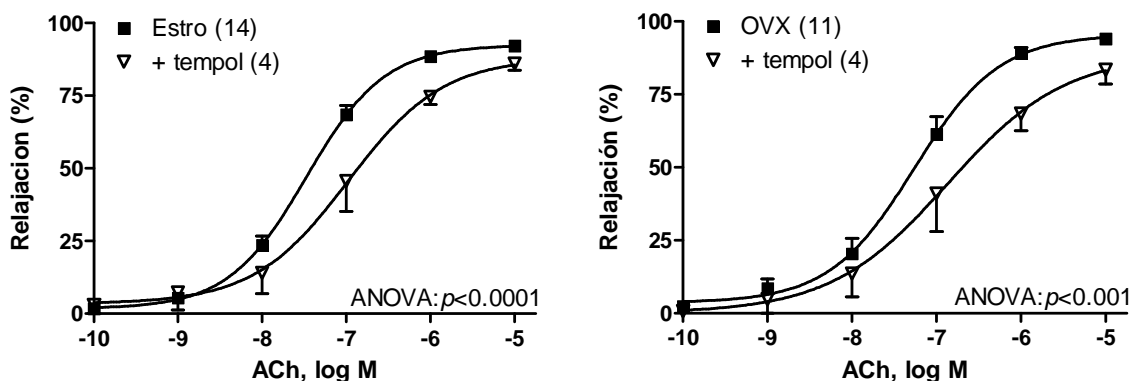


Figura 46: Efecto del tempol (0.1 mM) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1002 \pm 41.74 mg, N=14; Estro + tempol: 1150 \pm 87.80 mg, N=4; OVX: 1115 \pm 93.11 mg, N=11; OVX + tempol: 997.7 \pm 66.88 mg, N=4). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

Al incubar los segmentos con tempol, estamos eliminando del medio los O_2^- , aumentando la biodisponibilidad del NO, por lo que esperaríamos un incremento en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, como se ha descrito en machos (Blanco-Rivero *et al*, 2006), sin embargo obtenemos lo

contrario. Este resultado nos indica que los O_2^- en ambas situaciones tienen un papel relajador en la respuesta a ACh, bien directamente, o bien a través de la formación de $ONOO^-$, que también estamos inhibiendo al incubarlo con tempol.

Clásicamente, se han considerado a los O_2^- como una de las causas principales de desacoplamiento de la NOS, mediante el incremento en la oxidación de BH_4 , dando como resultado una mayor liberación de O_2^- (Singh *et al*, 2007). Sin embargo, recientemente se ha descrito que los O_2^- activan la eNOS (Xu y Pritchard, 2008), lo cual concuerda con la disminución en la respuesta a ACh que observamos tras la incubación con tempol. Así mismo, se ha analizado el papel de los $ONOO^-$ sobre la regulación de eNOS, y parece ser que los $ONOO^-$ ejercen una regulación negativa sobre la actividad de eNOS, inhibiendo la liberación de NO o incluso produciendo el desacoplamiento de la NOS (Sheehy *et al*, 1998; Münzel *et al*, 2005).

Además de todo esto, no hay que descartar la posibilidad de que sea el producto de la reacción que desencadena el tempol, el H_2O_2 , el responsable de esta disminución de la respuesta a ACh, mediante un papel vasoconstrictor como ha sido descrito en cultivo células de músculo liso de rata. (Torrecillas *et al*, 2001) o mediante su acción a través de la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores por activación de la COX (Gil-Longo y González-Vázquez, 2005).

3.4.- Papel de los aniones superóxido en la respuesta a NPS

Para entender y conocer mejor la participación de los O_2^- en la regulación del tono vascular y en relación a la función ovárica, realizamos curvas concentración-respuesta al donante de NO, NPS, en segmentos de ratas hembras control y ovariectomizadas.

El tempol (0.1 mM) en aortas de ratas control, no modificó la relajación inducida por NPS y la disminuyó en las de ratas ovariectomizadas (Figura 47).

El hecho de que en ovariectomizadas, el papel del tempol en la respuesta a NPS, coincida con su papel en ACh, nos indica que los O_2^- o derivados están participando activamente en la cascada de señalización del NO. Sin embargo, en los segmentos de aorta de los animales control, la participación de los O_2^- en la respuesta a ACh, parece ser independiente a la sensibilidad del NO en el músculo liso vascular. Por lo tanto estas diferencias indican que cuando

eliminamos los O_2^- del medio, la cascada de señalización NO/cGMP presenta diferente participación en presencia o ausencia de ovarios funcionales.

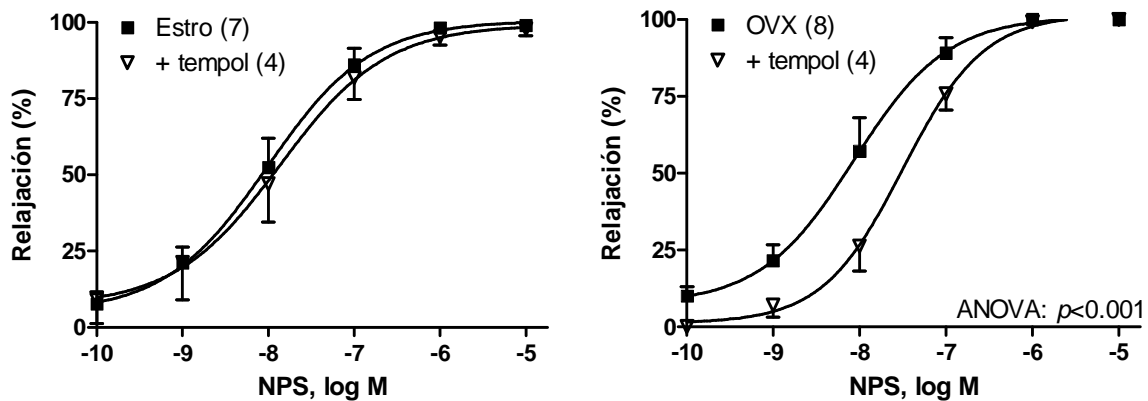


Figura 47: Efecto del tempol (0.1 mM) sobre la vasodilatación inducida por NPS (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 989 ± 120.5 mg, N=7; Estro + tempol: 1108 ± 166 mg, N=4; OVX: 1125 ± 133.4 mg, N=8; OVX + tempol: 868 ± 34.42 mg, N=4). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

Dadas estas diferencias, cabría esperar la existencia de una regulación adicional en el siguiente paso de la cascada de señalización, por lo que el siguiente paso fue analizar la actividad y papel funcional de la proteína quinasa dependiente de cGMP, la PKG.

4.- Proteína quinsa dependiente de cGMP (PKG)

La ovariectomía incrementó la actividad basal de PKG (Tabla 10).

	Estro (D.O./mg proteína)	OVX (D.O./mg proteína)	Número de datos
PKG	2.33 ± 0.33	$4.75 \pm 0.75^*$	5
PKA	2961 ± 611.4	$961 \pm 172.3^\#$	4
PKC	256.1 ± 89.5	$63.66 \pm 11.62^+$	6

Tabla 12: Actividades basales de la quinasas, PKG, PKA, PKC en los segmentos de aorta procedentes de animales control (fase Estro) y ovariectomizados (OVX). Los valores están expresados (media \pm SEM) como densidad óptica (D.O.)/mg proteína. * $p < 0.05$ frente a la situación control; # $p < 0.01$ frente a la situación control; + $p < 0.05$ frente a la situación control.

Se ha descrito que la regulación de la actividad de la PKG es sexo-dependiente (Teede *et al*, 2001), lo que apoya nuestros resultados, donde se pone de manifiesto la existencia de una regulación basal sobre la actividad de la PKG mediada por factores ováricos.

Respecto a las distintas hormonas sexuales femeninas se ha descrito que los estrógenos no modifican (Teede *et al*, 2001) o incrementan (White *et al*, 1995) la actividad de la PKG, mientras que la progesterona la inhibe (Cornwell *et al*, 2001). El hecho de que los niveles de las hormonas sexuales estén disminuidos en la ovariectomía, puede ser la causa de que la actividad basal de PKG este incrementada. Sin embargo, no se puede descartar su activación por otros factores vasoactivos que estén incrementados a causa de la ovariectomía, como la PGE₂ (Zhu *et al*, 2002).

Por otra parte, se ha descrito que en la regulación de la PKG participan otras quinasas como la PKC, de manera dependiente (Barman *et al*, 2004^b) o independiente (Hou *et al*, 2003) del cGMP. En este sentido, se ha descrito una regulación cruzada del cAMP sobre la PKG (Smiht *et al*, 1996), así como una interacción entre la actividad de PKG y PKA (Tantini *et al*, 2005).

Se ha descrito que la actividad de la PKC es dependiente de género (Kanashiro y Khalil, 2001) y experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que la actividad de la PKC está regulada por las hormonas sexuales masculinas, ya que la orquidectomía en machos incrementa la actividad de dicha enzima (Blanco-Rivero *et al*, 2007; Blanco-Rivero *et al*, 2005). Por tanto, el siguiente paso fue analizar si la presencia o ausencia de ovarios funcionales provoca modificaciones en la regulación de la actividad basal de las quinasas PKC y PKA.

Observamos que la ovariectomía provoca una disminución de la actividad basal de PKC y PKA (Tabal 10).

Con respecto a la regulación hormonal de estas quinasas también existe controversia en la bibliografía, ya que, se ha descrito que el estradiol activa (Ng *et al*, 2008) o no modifica (El-Mowafy *et al*, 2007) la actividad de PKA, mientras que la estrona (Rauchemberger *et al*, 2008) y progesterona (Miyagawa *et al*, 1997) activan PKC. Sin embargo, la mayoría de estos estudios analizan la regulación de las hormonas sexuales aisladas sobre las distintas quinasas en cultivos celulares, por lo tanto, estos datos descritos no son extrapolables a

nuestro modelo experimental, donde las distintas hormonas sexuales junto con diferentes factores ováricos, pueden estar participando en la regulación de las quinasa, a demás de la presencia de otros muchos factores vasoactivos que pueden estar regulando también su actividad basal.

4.1.- Participación de PKG en la respuesta a ACh

La incubación de KT 5823 (1 μ M), el inhibidor específico de la PKG, no provocó modificación alguna a la respuesta vasodilatadora inducida por ACh ni en los segmentos aórticos procedentes de animales control, ni de animales ovariectomizados (Figura 48).

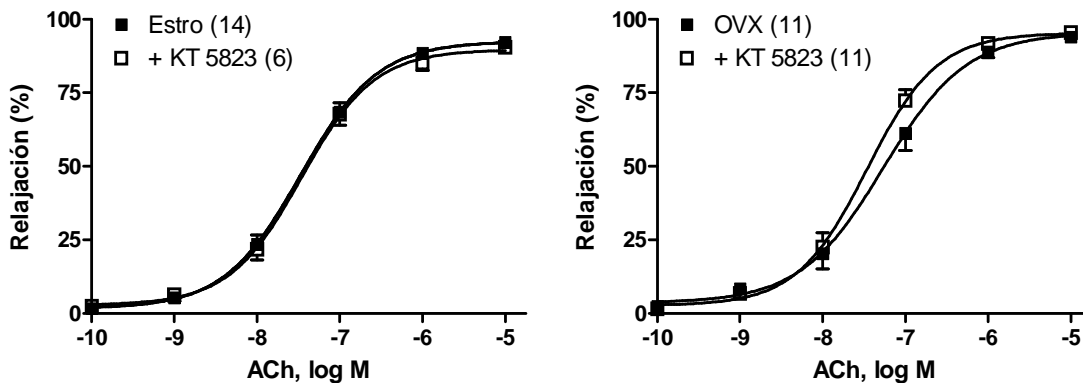


Figura 48. Efecto del KT 5823 (1 μ M) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0,1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1002 \pm 41.74 mg, N=14; Estro + KT 5823: 960.1 \pm 67.34 mg, N=6; OVX: 1115 \pm 93.11 mg, N=11; OVX + KT 5823: 1193 \pm 79.94 mg, N=11). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

Estos resultados muestran que, en nuestras condiciones experimentales, la PKG no tiene un papel funcional sobre la respuesta a ACh, pero no se puede descartar su posible papel sobre la liberación de NO endotelial y sobre su efecto vasodilatador. Adicionalmente, se ha descrito que el NO (Bolotina *et al*, 1994) y el cGMP (Eichhorn y Dobrev, 2007; Roh *et al*, 2007) pueden activar los canales BK_{Ca}, de manera PKG-independiente, lo cual, nos podría explicar el porqué no vemos diferencias en la respuesta a ACh con KT 5823.

4.2.- Participación de PKG la liberación de NO endotelial

La incubación con KT 5823 (1 μ M) disminuyó significativamente la liberación basal en ambos grupos animales, sin embargo sólo disminuyó la liberación inducida por ACh en las aortas procedentes de animales control (Figura 49).

No existen datos que pongan de manifiesto que la PKG vascular participe en la regulación de la liberación de NO endotelial, sin embargo, nosotros observamos que la liberación basal de NO, tanto en ratas control como en ovariectomizadas jóvenes está disminuida en presencia de KT 5823, sugiriendo la participación de la PKG en la regulación del tono basal.

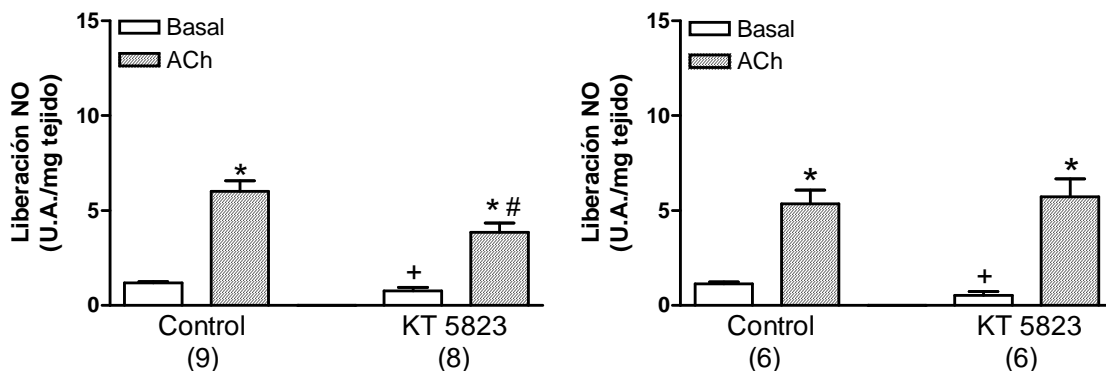


Figura 49: Efecto del KT 5823 (1 μ M) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh en los segmentos de aorta procedentes de ratas hembras jóvenes control (izquierda) y ovariectomizadas (derecha) precontraídas con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. * $p < 0.0001$, frente a su correspondiente situación basal; # $p < 0.05$, frente a la situación control estimulada con ACh; + $p < 0.05$ frente a la situación control basal.

No obstante, en las aortas de ratas control la PKG participa en la liberación de NO tras la estimulación con ACh, aunque este efecto no se pone de manifiesto en las curvas concentración-respuesta a ACh. La ovariectomía modifica dicho papel de la PKG en la liberación de NO endotelial tras la estimulación con ACh, poniendo, otra vez, de manifiesto la existencia de otros mecanismos implicados en la regulación del tono vascular en ausencia de ovarios funcionales.

En este sentido, no debemos olvidar la regulación positiva de la eNOS por los derivados de COX-2 en ratas ovariectomizadas (Martorell *et al*, 2009), pudiendo estar enmascarando el papel regulador de la PKG en la liberación de NO inducido por ACh.

4.3.- Participación de PKG en la respuesta a NPS

La incubación de KT 5823 (1 μ M), provocó una disminución en la respuesta vasodilatadora inducida por NPS, en los segmentos aórticos procedentes de animales control y ovariectomizados (Figura 50). Estos datos ponen de manifiesto la participación de la PKG en la cascada de señalización del NO, lo que está de acuerdo con otros investigadores (Lincoln *et al*, 2001).

Este papel funcional no se manifiesta en la respuesta endotelio-dependiente a ACh, lo que sugiere que la estimulación con ACh provoca la liberación de otros factores endoteliales diferentes al NO que mantienen dicha relajación a pesar de que la actividad de PKG este inhibida y/o que el NO y cGMP podrían ejercer efectos vasodilatadores de manera PKG-independiente.

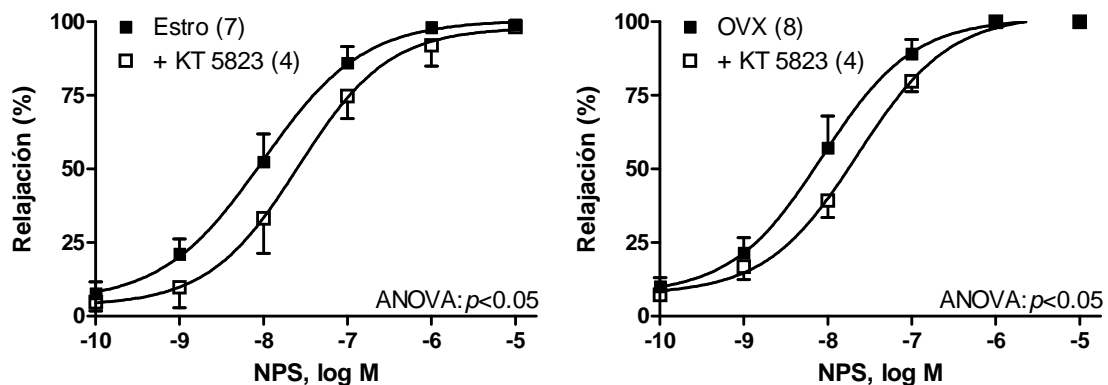


Figura 50: Efecto del KT 5823 (1 μ M) sobre la relajación inducida por NPS (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 989.3 \pm 120.5 mg, N=7; Estro + KT 5823: 926 \pm 91.43 mg, N=4; OVX: 1125 \pm 133.4 mg, N=8; OVX + KT 5823: 1037 \pm 105.5 mg, N=4). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

No obstante, hay que tener en cuenta que el KT 5823, a diferencia de otros inhibidores de la PKG, inhibe la actividad de la PKG, únicamente, inducida por el cGMP (Taylor *et al*, 2004), poniendo de manifiesto que la incubación con KT 5823 no inhibe la actividad de la enzima inducida por otros segundos mensajeros como cAMP (Smiht *et al*, 1996; White *et al*, 2000^a) y otras quinasa como PKC (Hou *et al*, 2003).

5.- Participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP}

Está ampliamente descrito la participación de los distintos canales de potasio en la regulación del tono vascular (Ko *et al*, 2008; Baranowska *et al*, 2007) y que la PKG modula la actividad de distintos canales de potasio en la respuestas vasomotoras. Teniendo en cuenta que en todos los resultados anteriormente expuestos se encuentran diferencias en la regulación del tono vascular provocadas por la ovariectomía, sería interesante ver si la función ovárica regula la actividad de estos canales. Para ello se analizará la expresión y participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP}.

5.1.- Expresión de los canales BK_{Ca}

En el análisis de la expresión de la subunidad α del canal BK_{Ca}, mediante Wester Blot, mostró la existencia de dos bandas, una de 75 KDa y otra de 50 KDa, como ya había sido publicado (Matharoo-Ball *et al*, 2003). Ambas bandas se corresponden con la expresión de la subunidad α , porque al analizar su expresión incubando las membranas con el péptido competitivo junto con el anticuerpo, se eliminó la señal de ambas.

La ovariectomía no modificó la expresión de la proteína de 75 KDa, ni la de 50 KDa, sin embargo, incremento la expresión de la subunidad β del canal de potasio dependiente de Ca²⁺ (Figura 51).

Se ha descrito que el 17 β -estradiol modula la expresión de la subunidad β de los canales BK_{Ca} en otros tejidos (Nagar *et al*, 2005), lo que concuerda con nuestros datos, donde observamos la existencia de una regulación hormonal en la expresión de de la subunidad β .

Puesto que la subunidad β es la que confiere actividad al canal (Nimigean y Magleby, 1999), se analizará posteriormente el efecto de la ovariectomía en la participación de dicho canal en la respuesta vasomotora inducida a ACh.

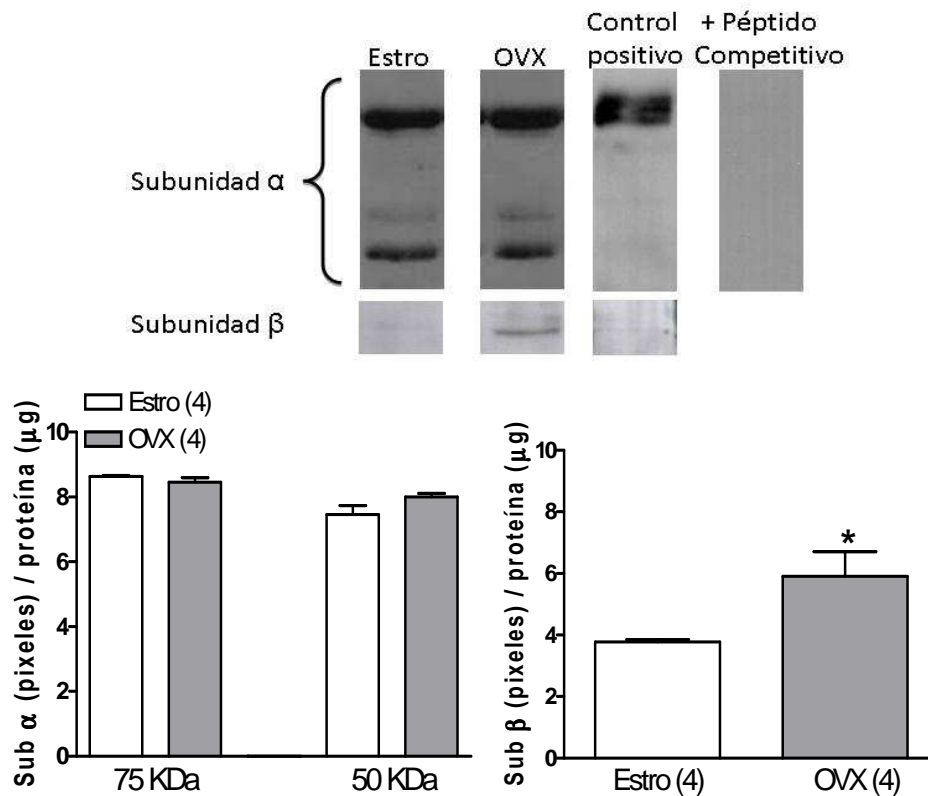


Figura 51: Resultados del análisis de la expresión de la subunidad (sub) α y β de los canales BK_{Ca} mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de la subunidad α y β de los canales BK_{Ca}. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de la subunidad α de los canales BK_{Ca} 75 y 50 kDa (izquierda) y la subunidad β de los canales BK_{Ca} (derecha) de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para la subunidad α y β de los canales BK_{Ca} (píxeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 μg). * $p < 0.05$ frente a la situación control.

5.2.- Expresión de los canales K_{ATP}

La ovariectomía no modificó la expresión de las subunidades kir6.1 y SUR2B del canal K_{ATP} (Figura 52).

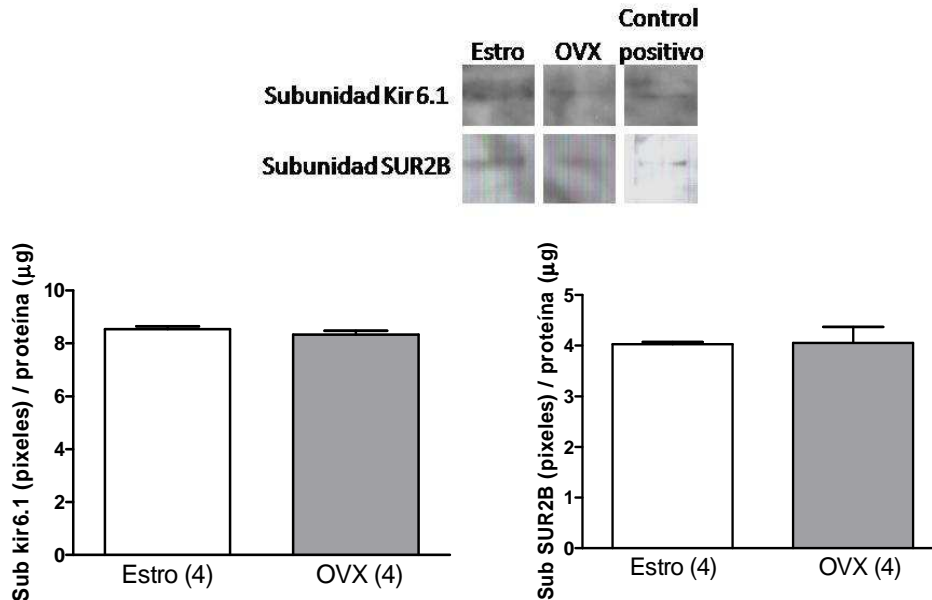


Figura 52: Resultados del análisis de la expresión de la subunidad (sub) Kir6.1 y SUR2B de los canales K_{ATP} mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de la subunidad Kir6.1 y SUR2B de los canales K_{ATP} . En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de la subunidad Kir6.1 de los canales K_{ATP} (izquierda) y la subunidad SUR2B de los canales K_{ATP} (derecha) de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para la subunidad Kir6.1 y SUR2B de los canales K_{ATP} (pixeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 µg).

Sin embargo, se ha descrito la regulación de los canales K_{ATP} por hormonas sexuales administradas de forma exógena (Ranki *et al*, 2002; Park *et al*, 2008^b) en otros tipos celulares. De todas maneras, aunque no observemos modificaciones de la expresión provocadas por la ovariectomía, este canal también está sujeto a la regulación de las distintas quinasas, cuyas actividades si están modificadas, por tanto, también se analizara su posible participación en la respuesta a ACh.

5.3.- Participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} en la respuesta a ACh

Funcionalmente, Glibenclamida (10 µM, inhibidor específico de los canales K_{ATP}), no modificó la respuesta inducida por ACh, ni en los segmentos de ratas

hembras control, ni en las ratas ovariectomizadas (Figura 53). Sin embargo, la Charibdotoxina (0.1 μ M, inhibidor de los canales BK_{Ca}) disminuyó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh únicamente en los segmentos procedentes de ratas control (Figura 53).

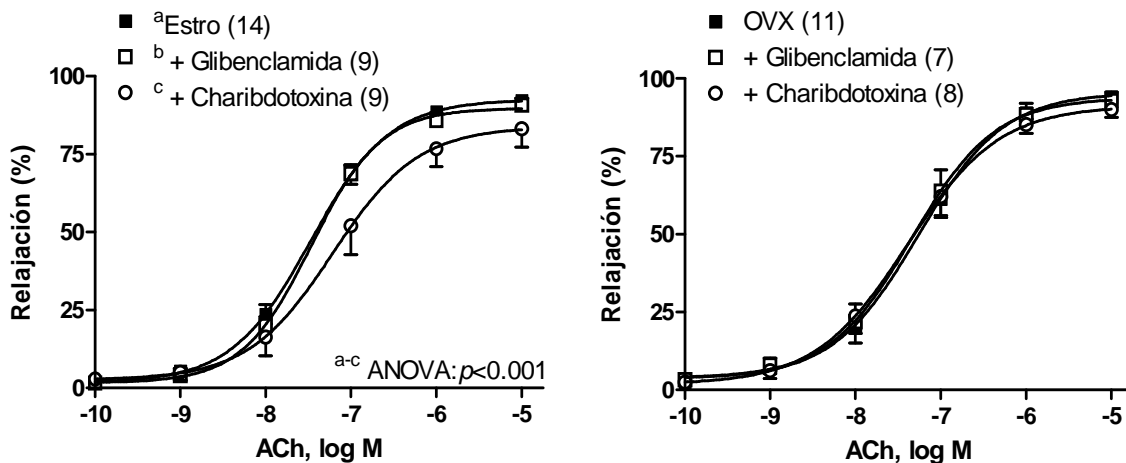


Figura 53: Efecto del Glibenclamida (10 μ M) y de la Cahribdotoxina (0.1 μ M) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1002 \pm 41.74 mg, N=14; Estro + Glibenclamida: 902.8 \pm 74.12 mg, N=9; Estro + Charibdotoxina: 1144 \pm 89.73 mg, N=9; OVX: 1115 \pm 93.11 mg, N=11; OVX + Glibenclamida: 933.1 \pm 59.97 mg, N=7; OVX + Cahribdotoxina: 1090 \pm 209.7 mg, N=8). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

Sorprendentemente, observamos que los K_{ATP} no parecen estar participando en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, mientras que existen publicaciones que describen un papel funcional para este canal. Sin embargo, se ha descrito que la Glibenclamida produce relajación endotelio dependiente por incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular y los niveles de cGMP (Chan *et al*, 2000), con lo que se podría explicar la ausencia de efecto en la respuesta a ACh. Así mismo, los canales BK_{Ca} , sólo parecen estar participando en aorta de ratas controles. No debemos descartar que ACh, desencadena la actividad simultánea de distintas vías de señalización en células endoteliales y musculares, que pueden estar modulando la actividad de estos canales y de otros. Así se ha descrito que distintos prostanoides pueden regular los canales de potasio, por ejemplo, la PGE_2 activa los canales BK_{Ca} , a través de la

activación de la PKG por cAMP (Zhu *et al*, 2002), mientras que le TXA₂ inhibe los canales de potasio (Scornik y Toro, 1992). Estos efectos opuestos por parte de los prostanoïdes, cuyos niveles están incrementados en ovariectomía (Martorel *et al*, 2009), podrían explicar la ausencia de participación en la respuesta inducida por ACh, sin descartar la posibilidad de que al modificar la actividad de algún canal a su vez se alteren la actividad de otros.

Con todo esto y sabiendo que la respuesta a ACh engloba tanto la liberación como la función del NO, se analizará a continuación la participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} en ambos procesos.

5.4.- Participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} en a respuesta a NPS

En la respuesta vasodilatadora inducida por NPS, la incubación con Glibenclamida (10 µM) no modifico la respuesta ni en aortas de ratas control, ni de ovariectomizadas, por el contrario, la incubación con Charibdotoxina (0.1 µM) disminuyo la respuesta en los dos casos (Figura 54).

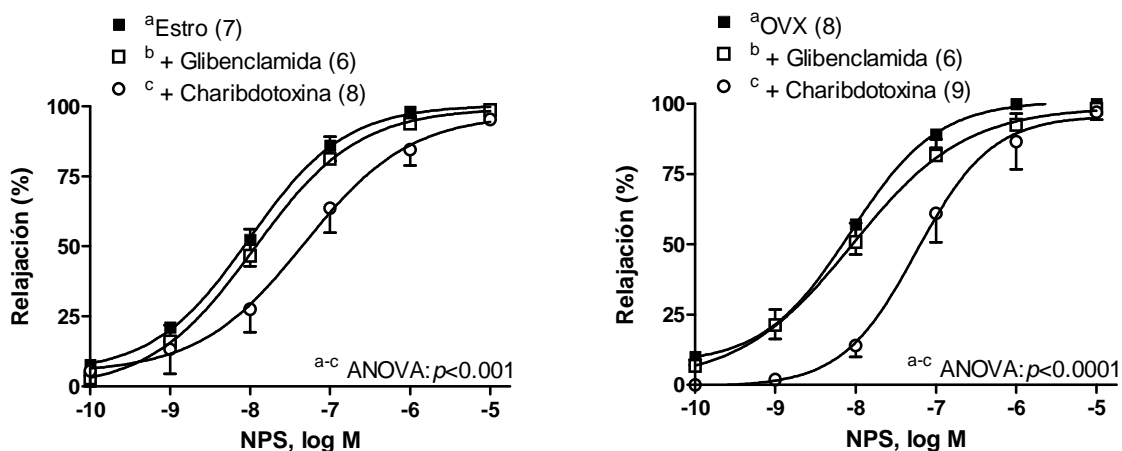


Figura 54: Efecto del Glibenclamida (10µM) y de la Charibdotoxina (0.1µM) sobre la vasodilatación inducida por NPS (0,1 nM -10 µM) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídos con NA (0.1 µM). Los resultados (media ± SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 989.3 ± 120.5 mg, N= 7; Estro + Glibenclamida: 889.8 ± 70.62 mg, N=6; Estro + Charibdotoxina: 1116 ± 78.79 mg, N=8; OVX: 1125 ± 133.4 mg, N=8; OVX + Glibenclamida: 1038 ± 152.2 mg, N=6; OVX + Charibdotoxina: 1303 ± 110.4 mg, N=9). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

Este resultado, indica la participación de los canales BK_{Ca} en la respuesta dilatadora al NO, datos que están de acuerdo con la participación de la PKG en

respuesta a NPS, sugiriendo la participación de la cascada clásica de señalización del NO: NO/cGMP/PKG/BK_{Ca}.

Sin embargo, en aorta de ratas ovariectomizadas este papel de los BK_{Ca} no se manifiesta en la respuesta a ACh, al igual que la actividad de la PKG, poniendo de manifiesto, otra vez, la existencia de otros factores que lo enmascaran. Estos resultados apoyarían la posibilidad de que prostanoïdes vasoconstrictores como el TXA₂ y la PGE₂ puedan estar inhibiendo y estimulando al canal, respectivamente, sin descartar la posibilidad de que el NO active directamente al canal BK_{Ca} (Bolotina *et al*, 1994).

A pesar de lo observado en las respuestas vasodilatadoras a ACh y NPS, no podemos descartar la posible participación de los canales de potasio, sobre la liberación de NO.

5.5.- Participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} en la liberación de NO endotelial

En aortas de animales control la incubación con Glibenclamida (10µM) disminuyó significativamente la liberación basal y la liberación estimulada con ACh con respecto a la situación control. Este efecto no se observó en animales ovariectomizados (Figura 55).

La incubación con Charibdotoxina (0.1µM), no modificó ni la liberación basal, ni la inducida por ACh, en ninguno de los dos grupos (Figura 55).

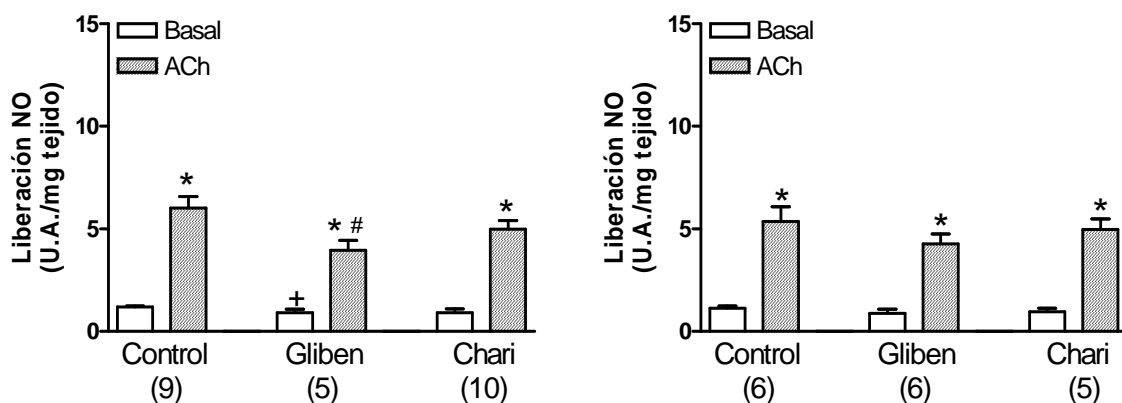


Figura 55: Efecto del Glibenclamida (Gliben 10 µM) y Charibdotoxina (Cahri, 0.1 µM) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh en segmentos de aorta procedentes de animales control (izquierda) y ovariectomizados (derecha) precontraídas con NA (0.1 µM). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. * $p < 0.0001$, frente a su correspondiente situación basal; # $p < 0.05$, frente a la situación control estimulada con ACh; + $p < 0.05$ frente a la situación control basal.

Está descrito que la activación de los canales K_{ATP} endoteliales incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} y la liberación de NO endotelial (Wang *et al*, 2007), lo que concuerda con nuestros datos en hembras control jóvenes donde observamos que su inhibición disminuye la liberación de NO tanto de manera basal como tras la estimulación con ACh. El hecho de que la Glibenclamida no modifique la liberación de NO en ratas ovariectomizadas puede ser debido a la sobreestimulación de la eNOS por derivados de COX-2 que sólo se produce en ratas ovariectomizadas (Martorell *et al*, 2009).

5.5.- Reactividad vascular al abridor de canales BK_{Ca} . Participación de la PKG y aniones superóxido.

Puesto que hemos observado la participación de los canales BK_{Ca} en la respuesta del NO sobre el músculo liso vascular, se analizó la respuesta al abridor de canales BK_{Ca} , NS 1619.

La ovariectomía no modificó la relajación inducida por NS 1619 (0,1 nM -10 μ M) en los segmentos aórtico precontraídos con 0.1 μ M NA ($p>0.05$).

Está descrito que tanto la PKG (White *et al*, 2000^a), como O_2^- (Ferrer *et al*, 1999; Liu y Gutterman, 2003) pueden modular la actividad de los canales BK_{Ca} , por lo tanto, se analizó el efecto del KT 5823 y tempol en la respuesta vasodilatadora inducida por NS 1619 en ambos grupos de animales.

La incubación con KT 5823 (1 μ M), no modificó la relajación inducida a NS 1619 en las aortas procedentes de animales control, sin embargo, la disminuyó en las procedentes de animales ovariectomizados (Figura 56).

Este resultado sugiere que la PKG ejerce una regulación positiva sobre el canal, solamente, cuando la función ovárica se ha eliminado, lo cual concuerda con que la actividad de la PKG sea mayor en los segmentos aórticos procedentes de animales ovariectomizados.

Al incubar con tempol (0.1 mM), obtenemos una disminución de la respuesta a NS 1619, tanto en segmentos procedentes de animales control, como de animales ovariectomizados (Figura 56) sugiriendo que los O_2^- podrían estar activando al canal, como ya ha sido descrito en aorta de machos orquidectomizados (Ferrer *et al*, 1999; Liu y Gutterman, 2003).

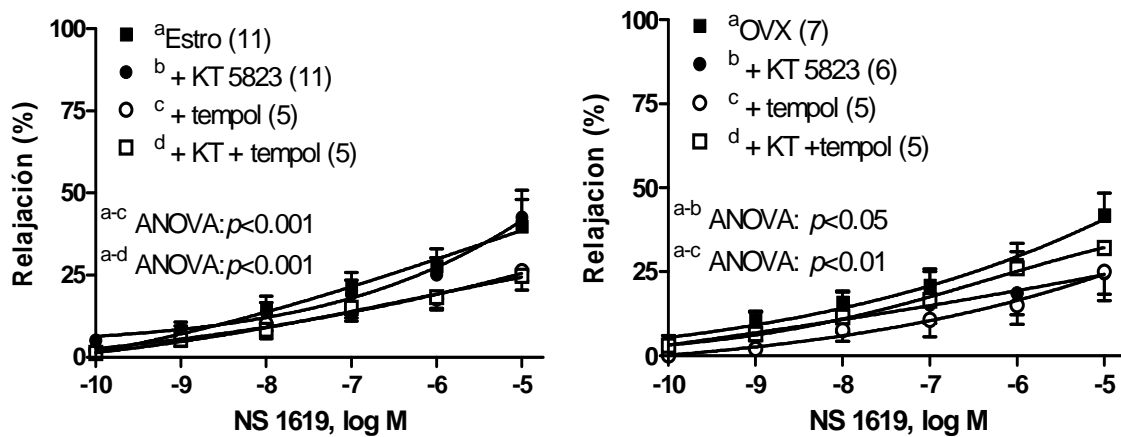


Figura 56: Efecto del KT 5823 (1 μ M), tempol (0.1mM) y KT+tempol sobre la vasodilatación inducida por NS 1619 (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras jóvenes control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 984.4 \pm 76.61 mg, N=11; Estro + KT 5823: 991.7 \pm 83.86 mg, N=11; Estro + tempol: 950 \pm 87.20 mg, N=5; Estro + KT 5823 + tempol: 981 \pm 66.0 mg, N=5; OVX: 931.3 \pm 57.82 mg, N=7; OVX + KT 5823: 1086 \pm 54.98 mg, N=6; OVX + tempol: 994 \pm 52.98 mg, N=5; OVX + KT 5823 + tempol: 956.3 \pm 91.0 mg, N=5). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

No obstante, no debemos olvidar que al incubar con tempol, estamos, por un lado, eliminando los O_2^- del medio y evitando la formación de $ONOO^-$, y por otro, favoreciendo la formación de H_2O_2 . Tanto los O_2^- , como los $ONOO^-$ y el H_2O_2 pueden regular la actividad de los canales BK_{Ca} .

Existen trabajos donde ponen de manifiesto que las especies reactivas de oxígeno modulan negativamente al canal, en concreto el H_2O_2 , que elimina la actividad fisiológica del canal (Brakemeier *et al*, 2003; Tang *et al*, 2004) y disminuyendo la probabilidad de que se active (DiChiara y Reinhart, 1997), lo cual explicaría por qué al incubar con tempol, en nuestro modelo experimental, disminuye la respuesta a NS 1619, pero también se le ha atribuido al H_2O_2 un papel activador de los canales BK_{Ca} a través de la cascada NO/sGC/cGMP en células endoteliales (Dong *et al*, 2008).

También se ha descrito un papel inhibitorio de los peroxinitritos sobre los canales BK_{Ca} del músculo liso vascular en arteria cerebral de rata (Brzezinska *et al*, 2000) o coronaria humana, donde especifican que los O_2^- no participan en la inactividad del canal (Liu *et al*, 2002). Sin embargo, estos resultados no explicarían la disminución de la respuesta a NS 1619 en presencia de tempol (Figura 57).

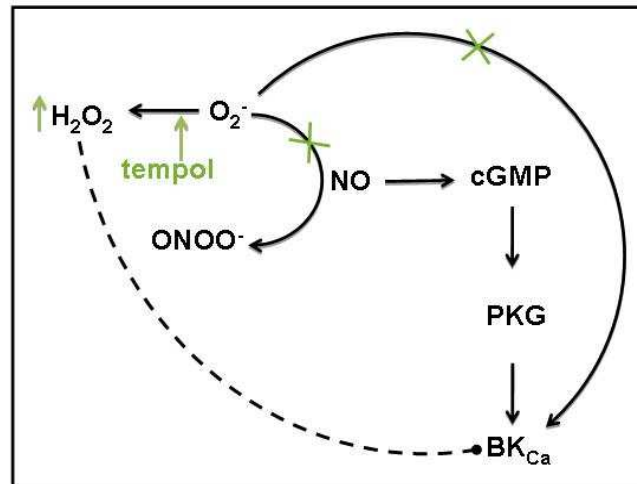


Figura 57. Esquema representativo del efecto del tempol sobre los BK_{Ca} en las aortas procedentes de ratas control y ovariectomizadas.

Con estos datos, se decidió analizar el efecto conjunto del KT 5823 y tempol en la respuesta vasodilatadora inducida por NS 1619 y observamos que la incubación conjunta del KT 5823 (1 μ M) y tempol (0.1mM) en aortas de ratas control disminuyó la respuesta a NS 1619 de la misma manera que el tempol (Figura 56), indicando que el efecto de la respuesta conjunta equivale al efecto del tempol únicamente y no existe una interacción entre los O₂⁻ y la PKG. Sin embargo, en ovariectomizadas la incubación conjunta KT (0.1 μ M) + tempol (0.1mM) provocó la desaparición del efecto inhibitorio del tempol y KT 5823, ya que en la respuesta a NS 1619 no se observa modificación (Figura 56), mostrando la existencia de una regulación diferente sobre los canales BK_{Ca} en la que participan los O₂⁻ o derivados y la PKG.

En este sentido, cuando en ovariectomizadas la PKG está bloqueada por el KT 5823 hace que la respuesta inducida por el NS 1619 en presencia de tempol sea igual que la respuesta del NS 1619 en situación control. Esto puede ser debido a que cuando la PKG está inhibida, la presencia de tempol provoque: (1) que la producción de H₂O₂ favorezca la formación de cGMP, que al no poder actuar sobre la PKG por la presencia de KT 5823, activa directamente (Luedders et al, 2006) o a través de PKA (Roh et al, 2007) los canales BK_{Ca}; (2) evitar la formación de ONOO⁻, aumentando la biodisponibilidad del NO, que puede activar directamente (Bolotina et al, 1994) o a través de la producción de cGMP los canales BK_{Ca} (Figura 58).

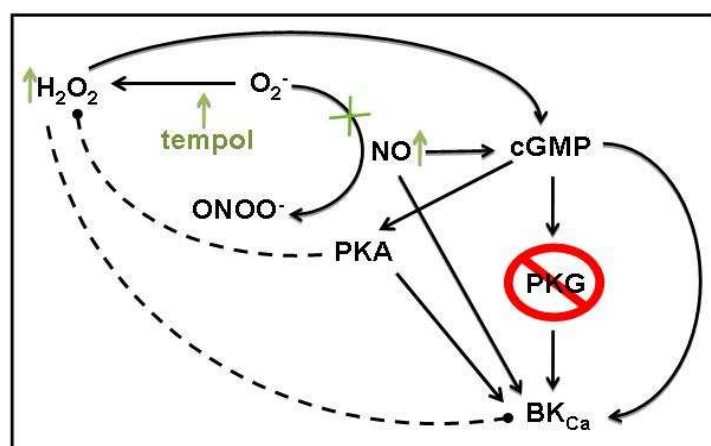


Figura 58: Efecto del tempol en las aortas procedentes de ratas ovariectomizadas cuando la actividad de la PKG está bloqueada.

Adicionalmente se ha descrito que la PKA activa la catalasa, favoreciendo la eliminación de H_2O_2 (Yano y Yano, 2002) y por consiguiente su efecto. Este dato estaría de acuerdo con la ausencia de efecto del tempol y KT 5823 en la respuesta inducida por NS 1619 en aortas de ratas ovariectomizadas como se muestra en la Figura 58.

En resumen, los resultados hasta aquí obtenidos ponen de manifiesto que, aunque la pérdida de función ovárica en jóvenes aumenta la producción de O_2^- y disminuya la formación de cGMP, sin modificar la liberación de NO, la respuesta vasodilatadora a ACh se mantiene. Esto probablemente es debido a la existencia de mecanismos compensatorios como el incremento de las actividades de las SODs y PKG.

Esta mayor actividad de la PKG es la responsable de que los canales BK_{Ca} presenten una mayor activación en aortas de ratas ovariectomizadas.

EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA REGULACION DEL TONO VASCULAR

Se ha descrito que el envejecimiento provoca disfunción endotelial (Matz y Andriantsitohaiana, 2003) y por tanto puede disminuir la relajación dependiente de endotelio (Andrawis *et al*, 2000). Por esto, el primer paso a abordar fue analizar la relajación endotelio-dependiente a ACh en segmentos de aorta procedentes de ratas jóvenes y viejas.

1.- Respuesta a ACh

El envejecimiento disminuyó la respuesta inducida por ACh (Figura 22), como ya había sido publicado (Vargas *et al*, 1997; Barton *et al*, 1997; Hashimoto *et al*, 1998).

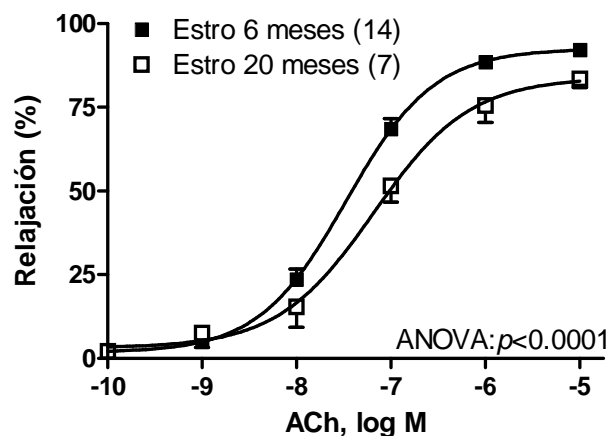


Figura 22: Efecto vasodilatador de ACh (0.1 nM- 10 μ M) en aortas de ratas hembras control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses de edad) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (medias \pm SEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro joven: 1002 ± 41.74 mg, N=14; Estro vieja: 933.7 ± 39.47 mg, N=7). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

Estos resultados están de acuerdo con el efecto deletéreo del envejecimiento sobre la relajación dependiente de endotelio (Andrawis *et al*, 2000). Adicionalmente, es posible que la disminución de los niveles de progesterona, estrona, 17β -estradiol y testosterona, para los que se han descrito efectos vasculares (Sakuma *et al*, 2002; Orshal y Khalil, 2004) participen en dicha alteración.

A continuación analizaremos si el envejecimiento causa esta disminución en la respuesta a ACh por una modificación en la liberación y/o función del NO.

2.- Participación del NO endotelial

2.1.- Participación del NO endotelial en respuesta a ACh

Para analizar la el papel funcional NO endotelial en la respuesta a ACh en el envejecimiento, se incubaron, los segmentos procedentes de ratas hembras control jóvenes y viejas, con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME.

La preincubación con L-NAME (0,1 mM), disminuyó la respuesta a ACh en ambos grupos (Figura 23). Sin embargo, el efecto inhibitorio del L-NAME en dicha respuesta fue mucho mayor en ratas viejas que en jóvenes (Figura 24).

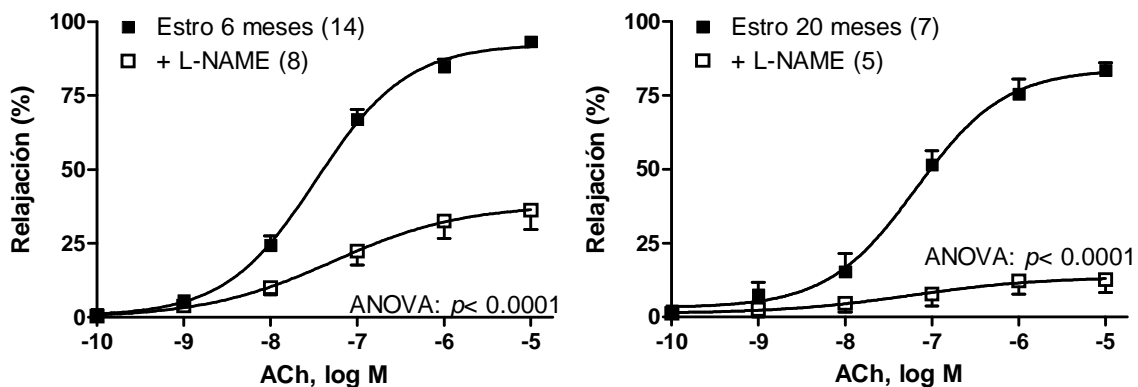


Figura 23: Efecto de L-NAME (0,1 mM) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras controles (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses de edad) precontraídos con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro joven: 1002 \pm 41.74 mg, N=14; Estro joven + L-NAME 1247 \pm 95.10 mg, N=8; Estro vieja: 933.7 \pm 39.47 mg, N=7; Estro viejas + L-NAME 1744 \pm 267.7 mg, N=5). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

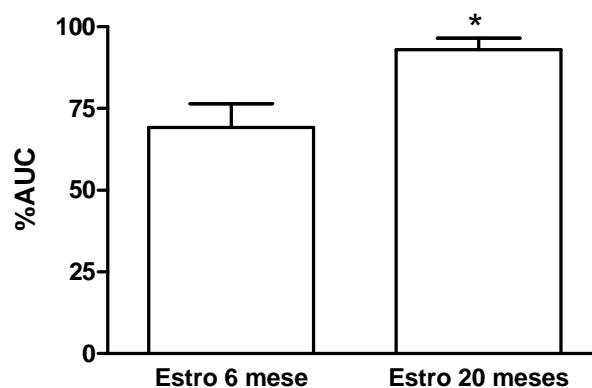


Figura 24: Diferencias del área bajo la curva (AUC) a ACh en segmentos de aorta de hembras control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses de edad), precontraídos con 0.1 μ M NA en ausencia o presencia de L-NAME (0.1 mM). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como el porcentaje del AUC en arterias control. * p <0.05 comparando ambos grupos.

Estos resultados sugieren que la respuesta vasodilatadora a ACh en aortas de ratas viejas es debida principalmente al NO, mientras que en jóvenes participan otros factores, diferentes al NO con un papel vasodilatador, pudiendo ser esta la causa de que la respuesta a ACh sea mayor en hembras jóvenes que en viejas.

Adicionalmente, la incubación con L-NAME modificó la precontracción a NA en los segmentos aórticos procedentes de animales control jóvenes (Estro joven: 1002 ± 41.74 mg, N=14; Estro joven + L-NAME 1247 ± 95.10 mg, N=8, $p<0.05$), y de animales control viejos (Estro vieja: 933.7 ± 39.47 mg, N=7; Estro viejas + L-NAME 1744 ± 267.7 mg, N=5, $p<0.05$), lo cual nos indica que en ambos grupos, el NO regula negativamente la respuesta contráctil a NA, como ya ha sido descrito por otros investigadores (Zonta *et al*, 1998; Bechara *et al*, 2008)

Al observar que existen diferencias en el papel funcional del NO en la respuesta inducida por ACh en los segmentos precontraídos con NA, se analizó si la sensibilidad al NO estaba modificada por el envejecimiento.

2.2.- Reactividad vascular a NPS

El envejecimiento disminuyó la respuesta vasodilatadora inducida por el donante de NO, NPS (Figura 25).

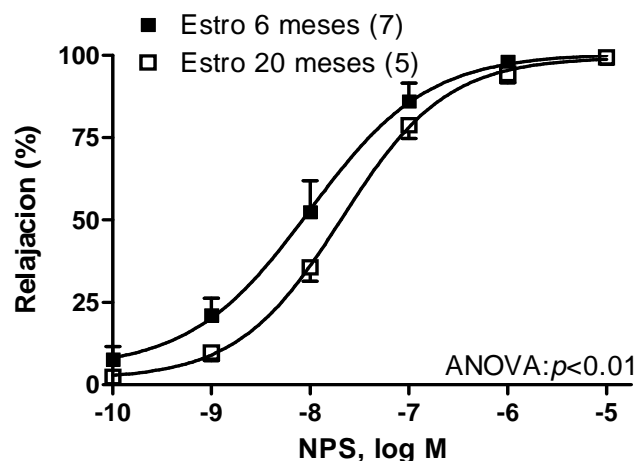


Figura 25: Efecto vasodilatador de NPS en aorta de ratas hembras control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses de edad) precontraídas con NA ($0.1 \mu\text{M}$). Los resultados (medias \pm SEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro joven: 989 ± 120.5 mg, N=7; Estro vieja: 1101 ± 180.7 mg, N=5). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

Existen discrepancias en la bibliografía sobre el efecto del envejecimiento en la respuesta inducida por el NPS. Se ha descrito que el envejecimiento disminuye (Wu *et al*, 2007^b; Stice *et al*, 2009) o no modifica (Vargas *et al*, 1997) la respuesta al donante de NO, NPS.

Puesto que observamos que en el envejecimiento, a pesar de que la participación del NO sea mayor, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh y NPS están disminuidas, se analizó posibles modificaciones en la expresión y/o actividad de la eNOS.

2.3.- Expresión de eNOS y liberación de NO endotelial

Muchos son los investigadores que han analizado el papel del envejecimiento en la expresión de eNOS, describiendo que esta puede estar incrementada (Cernadas *et al*, 1998; Wu *et al*, 2007^b), disminuida (Barton *et al*, 1997) o no modificada (Chou *et al*, 1998). En nuestro modelo experimental utilizado, el envejecimiento no modificó la expresión de eNOS (Figura 26).

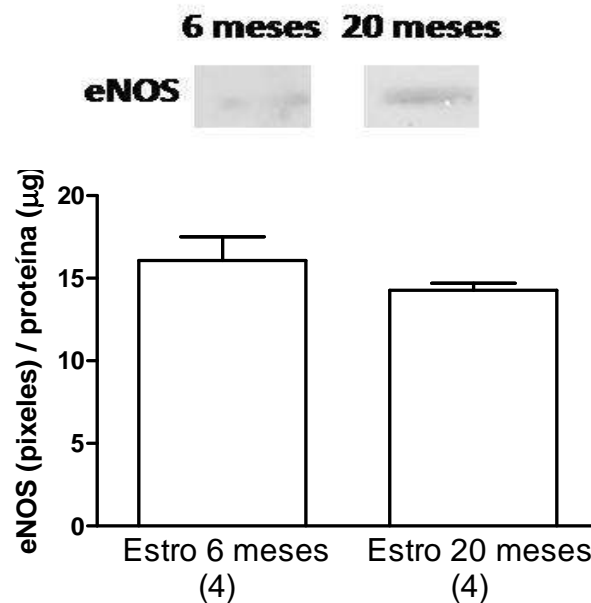


Figura 26. Resultados del análisis de la expresión de eNOS mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses de edad). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de eNOS. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de eNOS de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para eNOS (píxeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 μg).

También se ha analizado ampliamente la actividad de dicha enzima, habiéndose descrito resultados contradictorios, pues se ha demostrado que el envejecimiento puede incrementar (van der Loo *et al*, 2000) o disminuir (Cernadas *et al*, 1998; Chou *et al*, 1998; Ferrer y Balfagón, 2001) la actividad de eNOS.

Para analizar si, en nuestro modelo experimental, el envejecimiento modifica la actividad de eNOS, analizaremos si funcionalmente existen modificaciones en la liberación de NO basal y tras la estimulación con ACh.

El análisis de la liberación de NO endotelial muestra que el envejecimiento no modifica la liberación del NO endotelial basal e inducida por ACh (Figura 27).

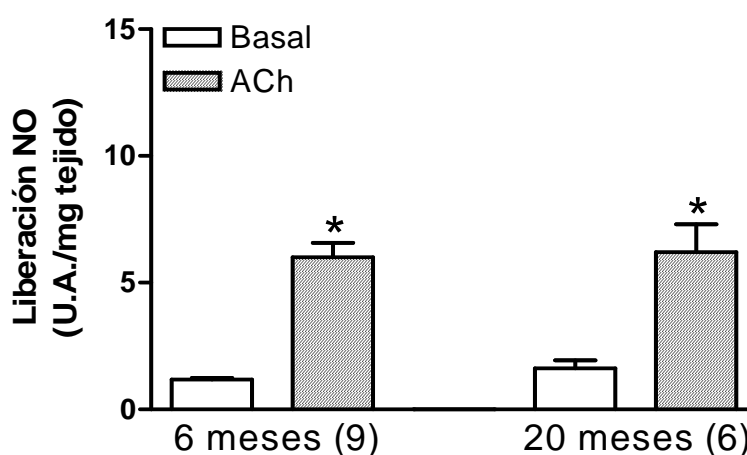


Figura 27: Liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh en segmentos procedentes de animales control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejos (20 meses), precontraídos con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados (media \pm SEM) se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. * $p < 0,05$ frente a la liberación basal de NO.

En este sentido, se ha descrito que el envejecimiento disminuye (Tschudi *et al*, 1996; Barton *et al*, 1997) o no modifica la liberación de NO. Por otra parte distintos estudios han puesto de manifiesto que las hormonas sexuales regulan la liberación de NO (Selles *et al*, 2005; Hisamoto *et al*, 2005). Hay que tener en cuenta que en estos estudios se analiza el papel de distintas hormonas sexuales aisladas sobre la liberación del NO. Por lo tanto los resultados obtenidos no son comparables a los encontrados en el modelo experimental utilizado.

Con estos datos, podemos concluir que la causa de que obtengamos una menor respuesta vasodilatadora inducida por ACh en los segmentos aórticos procedentes de ratas viejas, sabiendo que la liberación de NO no está modificada, es que la vía de señalización del NO esté disminuida en animales viejos, aunque la participación de otros factores endoteliales vasoactivos adicionales en jóvenes no se puede descartar.

También hay que tener en cuenta los ROS puedan estar implicados en el metabolismo del NO y serán analizados más adelante.

2.4.- Niveles de cGMP

Adicionalmente, no podemos descartar que el envejecimiento participe en la cascada de señalización del NO, por lo que el siguiente paso fue analizar la liberación de cGMP basal y tras estimulación con ACh.

Observamos que la liberación basal de cGMP fue igual en ambas situaciones, y que la ACh provocó un incremento en la liberación de cGMP mucho mayor en hembras jóvenes que en hembras viejas (Figura 28).

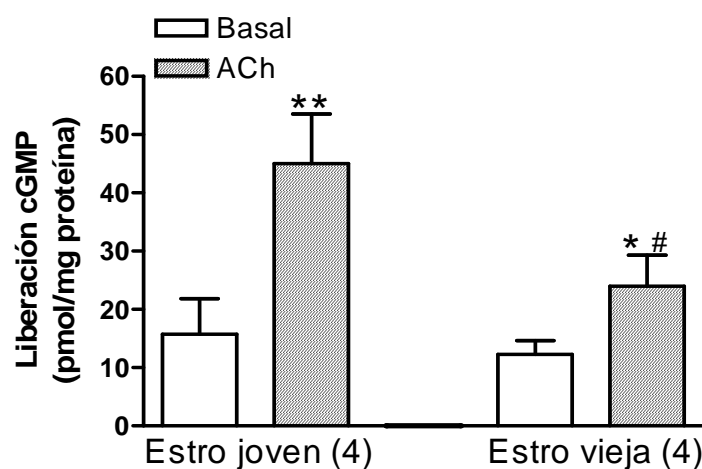


Figura 28: Liberación de cGMP basal y estimulada por ACh en segmentos procedentes de ratas hembra control (fase Estro) joven y viejas, precontraídos con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados (media \pm SEM) se expresaron como pmol/mg de tejido. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ frente a la liberación basal de cGMP, # $p < 0,05$ frente a la liberación de cGMP estimula con ACh en hembras control jóvenes.

Este resultado concuerda con la menor respuesta inducida por ACh y NPS en ratas viejas. Se ha descrito una disminución en los niveles de cGMP en aorta de

conejo por el envejecimiento (Ferrer *et al*, 1998), y que el envejecimiento disminuye la actividad de la sGC (Chen *et al*, 2000) lo que explicaría la disminución en la liberación de cGMP en los segmentos procedentes de ratas viejas, sin embargo también se ha descrito que se incrementa (Zieman *et al*, 2001) o que no se modifica (Ferrer *et al*, 2003) la actividad de la sGC por el envejecimiento.

2.5.- Participación del sGC en respuesta a ACh

El siguiente paso fue analizar el papel funcional de sGC en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, para ello se incubaron los segmentos de aorta procedentes de animales control jóvenes y viejos con el inhibidor específico de la sGC, ODQ. La preincubación con ODQ (10 μ M), disminuyó la respuesta a ACh en ratas jóvenes y viejas (Figura 29).

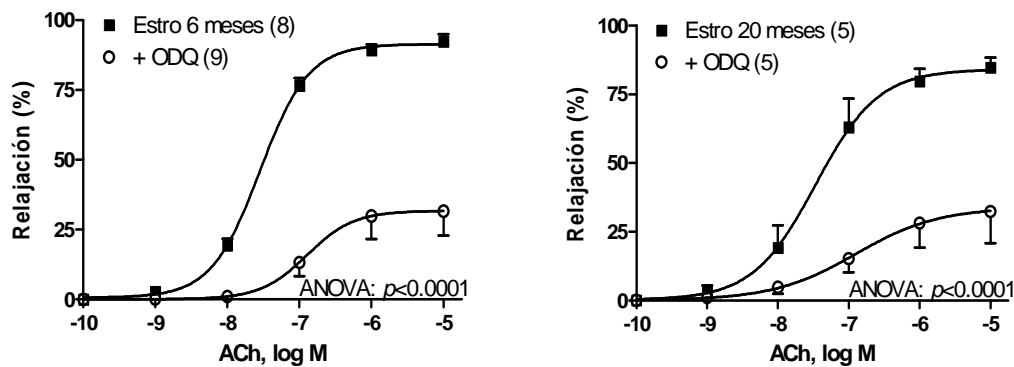


Figura 29: Efecto de ODQ (10 μ M) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM - 10 μ M) en segmentos de aorta de hembras controles (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses de edad) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro joven: 1071 ± 82.17 mg, N= 8; Estro joven + ODQ: 2427 ± 113 mg, N=9; Estro vieja: 1219 ± 164.2 mg, N=5; Estro vieja + ODQ: 2195 ± 48.32 mg, N=5). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

El papel inhibitorio del ODQ en la respuesta vasodilatadora a ACh fue similar en ambos grupos (Figura 30).

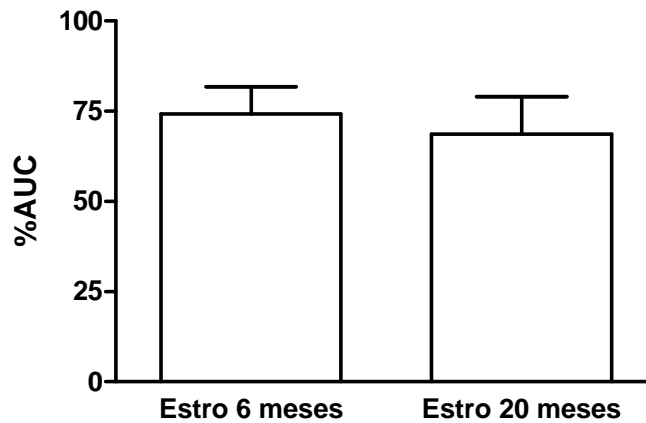


Figura 30: Diferencias del área bajo la curva (AUC) a ACh en segmentos de aorta de hembras control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses de edad), percontraídos con 0.1 μ M NA en ausencia o presencia de ODQ (10 μ M). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como el porcentaje del AUC en arterias control.

Observando el papel inhibitorio del ODQ en la respuesta inducida por ACh, junto con el papel inhibitorio de L-NAME, apreciamos que en los segmentos de aorta procedentes de animales jóvenes la participación del NO es a través de su acción sobre la sGC, pues el efecto inhibitorio de ODQ coincide con el efecto inhibitorio del L-NAME (Joven ODQ: 74.22 ± 7.54 , N=9; Joven L-NAME: 69.20 ± 7.3 , N=10, $p = 0.6389$). Sin embargo, en hembras viejas el efecto inhibitorio del L-NAME es mucho mayor que el del ODQ (vieja ODQ: 68.41 ± 10.44 , N=5; vieja L-NAME: 93.00 ± 3.5 , N=4, $p < 0.05$), lo que sugiere que en hembras viejas, la participación del NO es, en parte, a través de su acción sobre sGC, pero existe otros mecanismos por los que el NO media la respuesta a ACh independientes de la sGC.

3.- Aniones superóxido

Las especies reactivas de oxígeno participan en el metabolismo del NO (Gryglewski *et al*, 1986; Ferrer *et al*, 2000), en concreto los O_2^- , son cruciales en determinar la biodisponibilidad del NO (Beckman y Koppenol, 1996).

3.1.- Localización *in situ* de aniones superóxido

El envejecimiento no modificó los niveles de O_2^- (Figura 31).

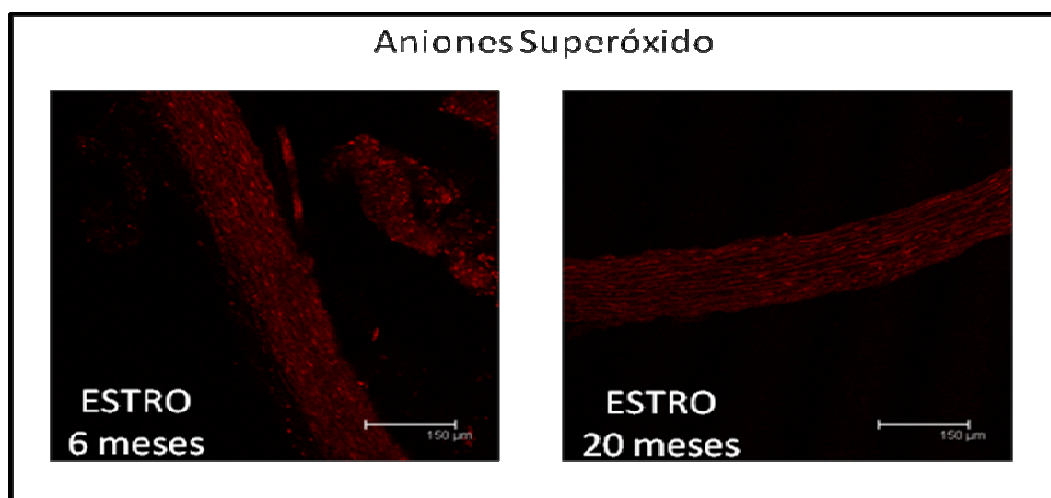


Figura 31. Detección *in situ* de aniones superóxido mediante microscopía confocal en segmentos aórticos procedentes de animales control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejos (20 meses de edad). La figura es una imagen representativa de una sección arterial de cuatro segmentos de cada grupo magnificada 200x.

Sin embargo, se ha descrito que el envejecimiento está acompañado de un incremento de especies reactivas de oxígeno (van der Loo *et al*, 2000; Moon *et al*, 2001) que provocan estrés oxidativo. Sin embargo, al igual que con el NO, los O_2^- también son el producto de su producción y eliminación. Su eliminación esta llevada a cabo por distintos sistemas detoxificadores como ha sido comentado en el apartado anterior. Entre las distintas enzimas implicadas, es de gran importancia la función de la SOD, por lo que su expresión y actividad serán analizadas a continuación

3.2.- Expresión de Cu/ZnSOD y MnSOD. Actividad de SOD

En la aorta de rata las isoformas predominantes son la Cu/ZnSOD citosólica (Namgaladze *et al*, 2005) y MnSOD mitocondrial.

El envejecimiento no modifica expresión de Cu/ZnSOD, sin embargo, incrementa la expresión de la isoforma MnSOD (Figura 32).

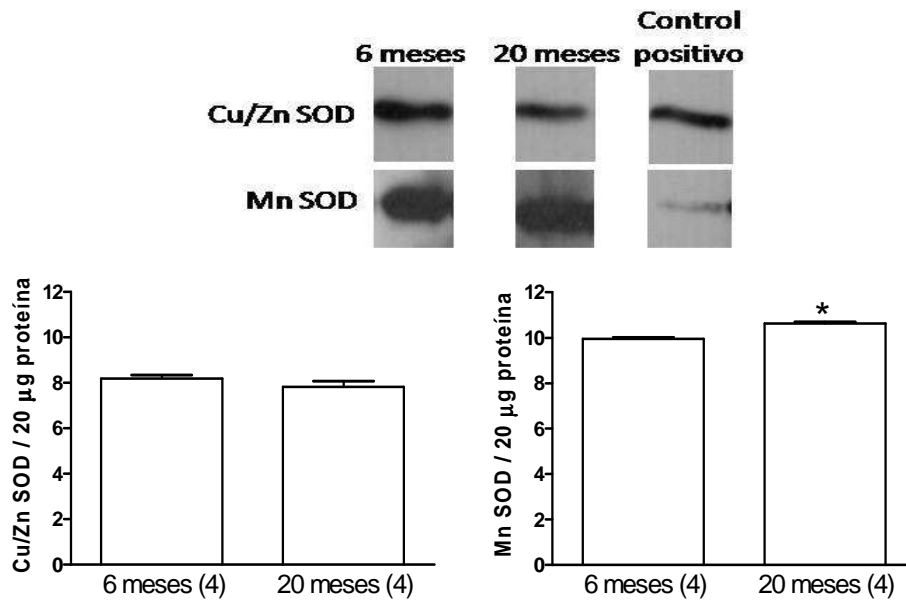


Figura 32: Resultados del análisis de la expresión de Cu/ZnSOD y MnSOD mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses de edad). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de Cu/ZnSOD y MnSOD. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de Cu/ZnSOD (izquierda) y MnSOD (derecha) de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para Cu/ZnSOD y MnSOD (píxeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 µg). * $p < 0.01$ frente a la situación control.

El envejecimiento provocó un incremento significativo en la actividad de las SODs (Figura 33).

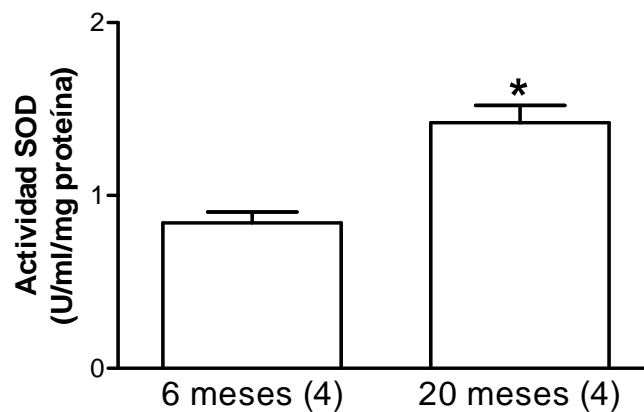


Figura 33. Actividad de la SOD en segmentos de aorta procedentes de animales control (fase Estro) jóvenes (6 meses) y viejas (20 meses). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como unidades de SOD/ml por mg de proteína. El número de animales está indicado entre paréntesis. * $p < 0.001$ frente a las ratas control.

Estos resultados sugieren que la mayor actividad y/o expresión de SOD, puedan ser los responsables de que la detección de aniones *in situ* sea igual en ambas situaciones. Adicionalmente, se ha descrito que la expresión o actividad de las distintas isoformas de SOD pueden estar alteradas en situaciones patofisiológicas, donde se encuentra alterada la producción de aniones superóxido (Kobayashi *et al*, 2002; Tanaka *et al*, 2005; Blanco-Rivero *et al*, 2006), pero también se ha descrito que el envejecimiento no modifica su actividad (Barton *et al*, 1997).

Por lo tanto, el envejecimiento en ratas hembras controles provoca una disminución en la respuesta inducida por ACh, y NPS, por una disminución en la formación de cGMP. Adicionalmente, el sistema detoxificador de la SOD está incrementado, lo cual indica que la producción de O_2^- pudiera estar incrementada en el envejecimiento, y no se debe descartar que pudieran participar en la regulación del tono basal o tras estimulación con ACh y/o NPS. Puesto que el envejecimiento en las ratas control va acompañado de una disminución en los niveles de hormonas sexuales, a continuación se analizará el efecto de la pérdida de la función ovárica sobre la regulación del tono vascular en el envejecimiento.

EFFECTO DE LA DISFUNCIÓN OVÁRICA EN LA REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR EN ANIMALES VIEJOS

1.- Respuesta a ACh

La respuesta vasodilatadora inducida por ACh fue similar en hembras controles y en ovariectomizadas de 20 meses de edad (Figura 59).

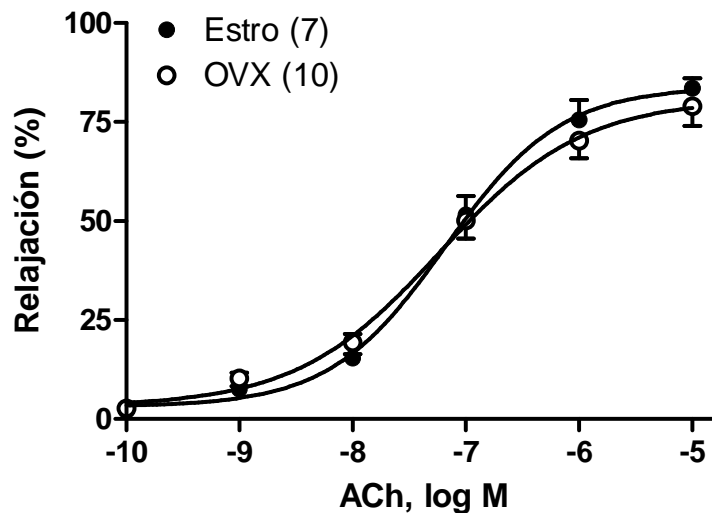


Figura 59: Efecto vasodilatador de ACh (0.1 nM- 10 μ M) en aorta de ratas hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (medias \pm SEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 933.7 ± 39.47 mg, N=7; OVX: 1120 ± 79.48 mg, N=10). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

El hecho de que la ovariectomía a los 20 meses no modifique la respuesta a ACh coincide con los datos obtenidos a los 6 meses, donde la ovariectomía tampoco modificaba la respuesta a ACh. Sin embargo, existen datos que avalan que la relajación inducida por ACh está disminuida en ratas ovariectomizadas viejas (Castillo *et al*, 2005), pero en este estudio, tanto la cepa del animal, como la edad a la que se produce y el tiempo de mantenimiento de la ovariectomía son diferentes.

Aunque la respuesta a ACh no se modifique, no se debe descartar cambios en la liberación y/o función de los distintos factores endoteliales, y que la disfunción ovárica junto con el envejecimiento modulen la participación del NO, por lo que será analizado a continuación.

2.- Participación del NO endotelial

2.1.- Participación del NO endotelial en respuesta a ACh

Con el fin de analizar la implicación del NO endotelial en la respuesta a ACh en las aortas de hembras control y ovariectomizadas de 20 meses de edad se incubaron con el inhibidor de la síntesis del NO, L-NAME. La preincubación con L-NAME (0,1 mM), eliminó prácticamente la respuesta a ACh en las aortas de de hembras control y ovariectomizadas de lo que se deduce que la respuesta vasodilatadora a ACh es completamente dependiente del NO en ambos grupos de animales (Figura 60). La inhibición de la respuesta a ACh producida por la incubación con L-NAME, fue similar en los segmentos procedentes de ratas control y ovariectomizadas de 20 meses de edad (Figura 61).

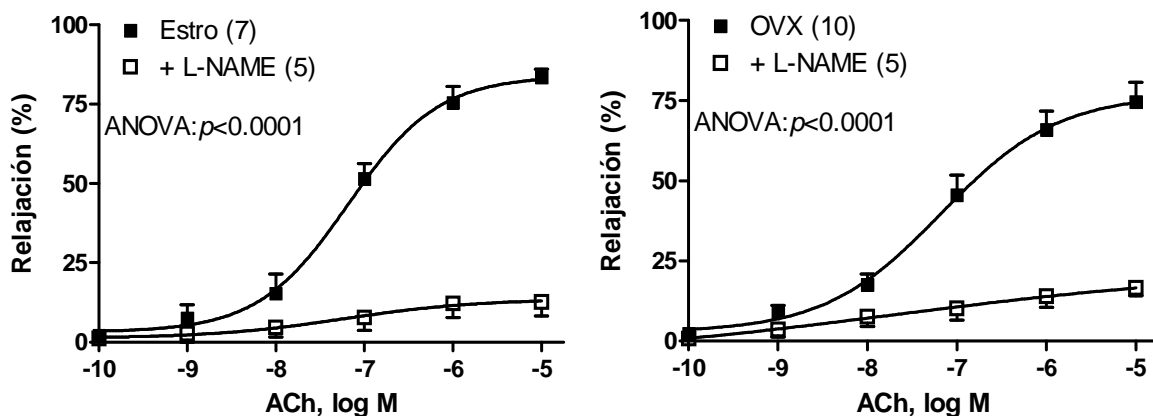


Figura 60: Efecto de L-NAME (0,1 mM) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 933.7 ± 39.47 mg, N=7; Estro + L-NAME: 1744 ± 267.7 mg, N= 5; OVX: 1120 ± 79.48 mg, N=10; OVX + L-NAME: 1828 ± 303.9 mg, N= 5). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

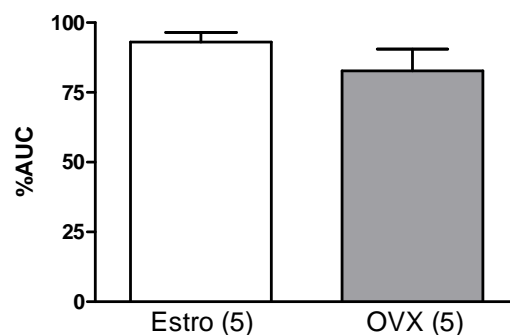


Figura 61: Diferencias del área bajo la curva (AUC) a ACh en segmentos de aorta de hembras control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) viejas, precontraídos con 0.1 μ M NA en ausencia o presencia de L-NAME (0.1 mM). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como el porcentaje del AUC en arterias control.

Estos datos son diferentes que los obtenidos con la ovariectomía en ratas de 6 meses, donde se apreciaba la participación de otros factores endoteliales, aparte del NO, responsables de completar la relajación inducida por ACh. Adicionalmente, la incubación con L-NAME incrementó la precontracción a NA (0.1 μ M) en los segmentos aórticos procedentes de animales viejos control (Estro: 933.7 ± 39.47 mg, N=7; Estro + L-NAME: 1744 ± 267.7 mg, N= 5, $p<0.05$) y ovariectomizados (OVX: 1120 ± 79.48 mg, N=10; OVX + L-NAME: 1828 ± 303.9 mg, N= 5, $p<0.05$) mostrando una regulación negativa del NO sobre la respuesta contráctil inducida por la dosis única de NA, sin embargo, este resultado no coincide con lo obtenido en ovariectomizadas jóvenes, indicando que el envejecimiento en ovariectomizadas provoca cambios funcionales sobre la participación de NO en la respuesta a ACh en los segmentos precontraídos con NA. Aunque la participación del NO en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh es igual en ambos casos, no podemos descartar la posibilidad de que la sensibilidad al NO en las células del músculo liso esté modificada, por lo tanto el siguiente paso fue analizar la respuesta al donante de NO, NPS.

2.2.- Reactividad vascular a NPS

La vasodilatación inducida por NPS no se vio modificada por la ovariectomía en el envejecimiento, indicando que la pérdida de función ovárica no altera la sensibilidad del músculo liso vascular al donante de NO (Figura 62) al igual que sucede en hembras jóvenes.

Es de esperar que en hembras viejas ovariectomizadas y con una leve hipertensión encontráramos evidencias de una posible disfunción endotelial (Riviero *et al*, 2001), sin embargo nuestros resultados muestran que la respuesta endotelio-dependiente y la sensibilidad a NO no está modificada. En este sentido y sabiendo que en hembras jóvenes la ovariectomía produce cambios en la señalización del NO, se analizó si la expresión de eNOS y la liberación de NO estaba modificada en el envejecimiento.

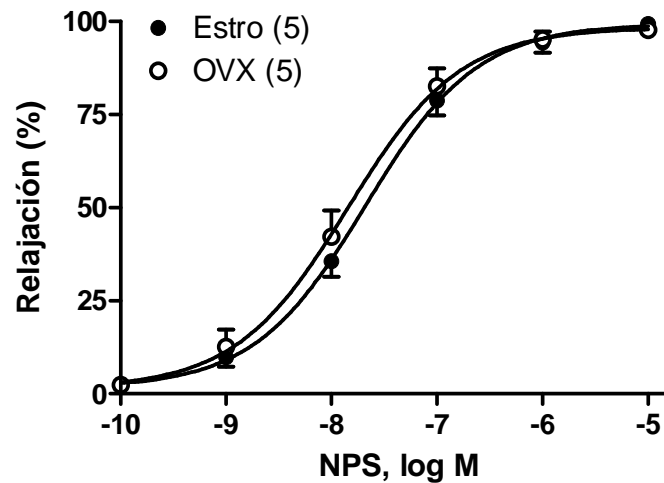


Figura 62: Efecto vasodilatador de NPS (0.1 nM- 10 µM) en aorta de ratas hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 µM). Los resultados (medias \pm SEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1101 ± 180.7 mg, N=5; OVX: 1134 ± 153.8 mg, N=5). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

2.3.- Expresión de eNOS y liberación de NO endotelial

Se observó que la ovariectomía en el envejecimiento no modificó la expresión de eNOS. (Figura 63).

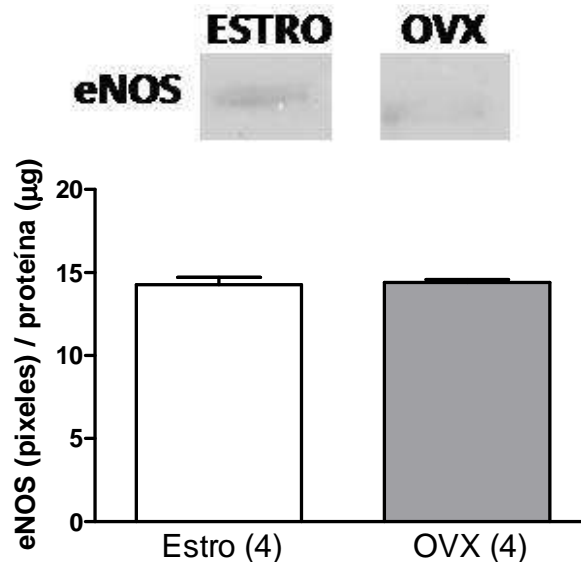


Figura 63: Resultados del análisis de la expresión de eNOS mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras viejas controles (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de eNOS. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de eNOS de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias \pm SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para eNOS (píxeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 µg).

Este resultado coincide con el obtenido en hembras jóvenes, donde la ovariectomía tampoco modificó la expresión de eNOS. Adicionalmente, ha sido descrito que la utilización de moduladores estrogénicos en ratas viejas ovariectomizadas no modifica la expresión de eNOS (Wong *et al*, 2006), lo cual está de acuerdo con nuestro resultado, pero aun así, no podemos descartar que la actividad de la eNOS esté o no modificada por la ovariectomía en el envejecimiento.

El siguiente paso, por tanto, consistió en analizar la liberación de NO basal e inducida tras la estimulación con ACh en aortas de hembras controles y ovariectomizadas. La ovariectomía no produjo cambios en la liberación basal de NO. En ambos caso la ACh incremento la liberación de NO, pero este incremento fue menor en hembras ovariectomizadas (Figura 64).

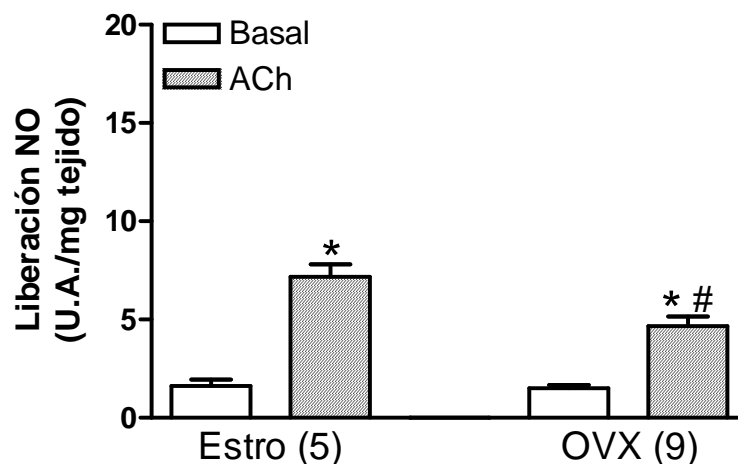


Figura 64: Liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh en segmentos procedentes de animales viejos control (fase Estro) y ovariectomizados (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados (media \pm SEM) se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. * $p < 0,05$ frente a la liberación basal de NO; # $p < 0.01$ frente a la situación control.

Se ha descrito que la ovariectomía en el envejecimiento produce una disminución de los niveles de los metabolitos del NO (nitritos/nitratos) plasmáticos (Moien-Afshari *et al*, 2003), lo cual concuerda con nuestro resultado.

Cuando el envejecimiento cursa con hipertensión se describió la posibilidad de que estuvieran alterado la expresión de eNOS y/o la liberación de NO (Marín y

Martin-Rodríguez, 1999), nosotros observamos que únicamente están modificados los niveles de NO endotelial tras la estimulación con ACh.

Con estos resultados cabría esperar, que la cascada de señalización del NO, estuviera modificada, aunque la participación de mismo en la respuesta a ACh sea la misma, por eso se analizo la liberación de cGMP inducida por ACh.

2.4.- Niveles de cGMP

Los niveles de cGMP basales no se vieron modificados por la ovariectomía en animales viejos y la estimulación con ACh provocó un incremento similar en ambos grupos de animales (Figura 65).

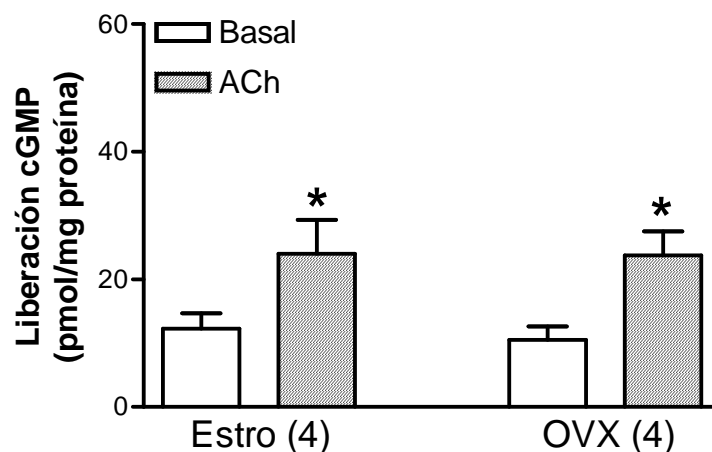


Figura 65: Liberación de cGMP basal y estimulada por ACh en segmentos procedentes de animales viejos control (fase Estro) y ovariectomizados (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados (media \pm SEM) se expresaron como pmol/mg de tejido. * $p < 0,05$ frente a la liberación basal de cGMP.

Estos resultados nos muestran que aunque la liberación de NO sea diferente tras el estímulo de ACh, provocan la misma liberación de cGMP, lo que explicaría que la respuesta a NPS no esté modificada por la ovariectomía, sin embargo existen estudios previos que ponen de manifiesto que la ovariectomía en animales viejos provoca una disminución en la expresión de las subunidades de la sGC, lo cual disminuiría el efecto del NO en las células de músculo liso vascular (Stice *et al*, 2009).

Adicionalmente, se ha descrito la existencia de otros factores endoteliales, diferentes al NO, que activan a la sGC (Teede *et al*, 2001) pudiendo ser esta la

causa de que obtengamos los mismos niveles de cGMP tras la estimulación con ACh en ambos grupos, aunque, la ovariectomía en ratas viejas provoque una disminución en la liberación de NO tras la estimulación con ACh, por lo tanto, analizaremos a continuación, la participación de la sGC en respuesta a ACh, en nuestro modelo experimental.

2.5.- Participación de la sGC en respuesta a ACh

Para ello se incubaron los segmentos de aorta procedentes de animales viejos controles y ovariectomizados con ODQ (10 μ M). La preincubación con ODQ redujo la respuesta a ACh en ratas viejas (Figura 66).

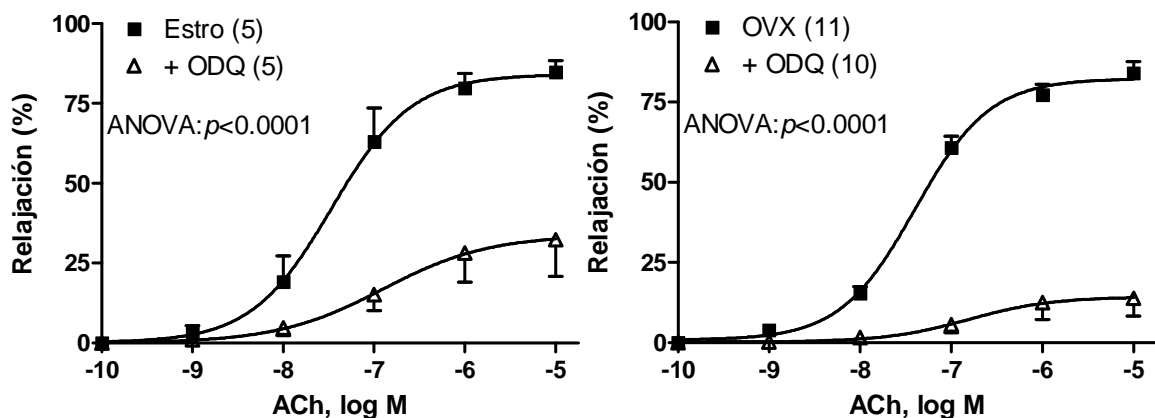


Figura 66: Efecto del ODQ (10 μ M) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM - 10 μ M) en segmentos de aorta de hembras viejas controles (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1219 \pm 164.2 mg, N=5; Estro + ODQ: 2195 \pm 48.32 mg, N=5; OVX: 1457 \pm 78.93 mg, N=11; OVX + ODQ: 2539 \pm 136.1 mg, N=10). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

El análisis del área bajo la curva (AUC), muestra que el papel inhibitorio del ODQ en la respuesta vasodilatadora a ACh es mayor en la ovariectomía (Figura 67).

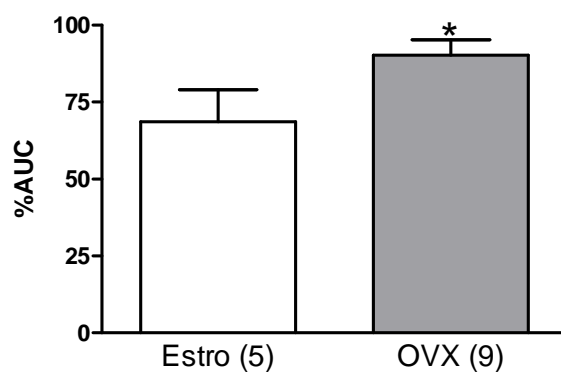


Figura 67: Diferencias del área bajo la curva (AUC) a ACh en segmentos de aorta de hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX), percontraídos con 0.1 μ M NA en ausencia o presencia de ODQ (10 μ M). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como el porcentaje del AUC en arterias control. * p <0.05 comparando ambos grupos.

En las ratas ovariectomizadas, observamos que el papel inhibitorio del ODQ, coincide prácticamente con el papel inhibitorio del L-NAME (OVX+ODQ: 90.26 \pm 4.99 %AUC, N=9; OVX+L-NAME: 82.75 \pm 7.83 %AUC, N=4, p =0.43), lo que nos indica que el papel funcional del NO está mediado únicamente por la activación de la sGC en respuesta a ACh. Sin embargo, en ratas control al incubarse con L-NAME, obtenemos una inhibición mayor que al incubarse con ODQ (ESTRO+ODQ: 68.61 \pm 10.44 %AUC, N= 5; ESTRO+L-NAME: 93.00 \pm 3.5 %AUC, N=4, p <0.05), indicando que en la respuesta a ACh, el NO además de activar la sGC también participa por otros mecanismos.

Adicionalmente, la incubación con ODQ incrementó la precontracción a NA (0.1 μ M) en los segmentos aórticos procedentes de animales viejos controles (Estro: 1219 \pm 164.2 mg, N=5; Estro + ODQ: 2195 \pm 48.32 mg, N=5, p <0.001) y ovariectomizados (OVX: 1457 \pm 78.93 mg, N=11; OVX + ODQ: 2539 \pm 136.1 mg, N=10, p <0.0001), este resultado concuerda con el incremento de la respuesta a la dosis única de NA producido por el L-NAME en las aortas procedentes de animales viejos, dando a conocer que el NO/cGMP regula negativamente la respuesta contráctil a la dosis única de NA.

3.- Aniones superóxido

Recordamos que una de las principales moléculas que regulan la biodisponibilidad del NO, son los O_2^- y que sus niveles, tal y como hemos visto en hembras jóvenes están regulados por la función ovárica.

3.1.- Localización *in situ* de aniones superóxido

La ovariectomía en el envejecimiento provocó un incremento en los niveles de O_2^- (Figura 68).

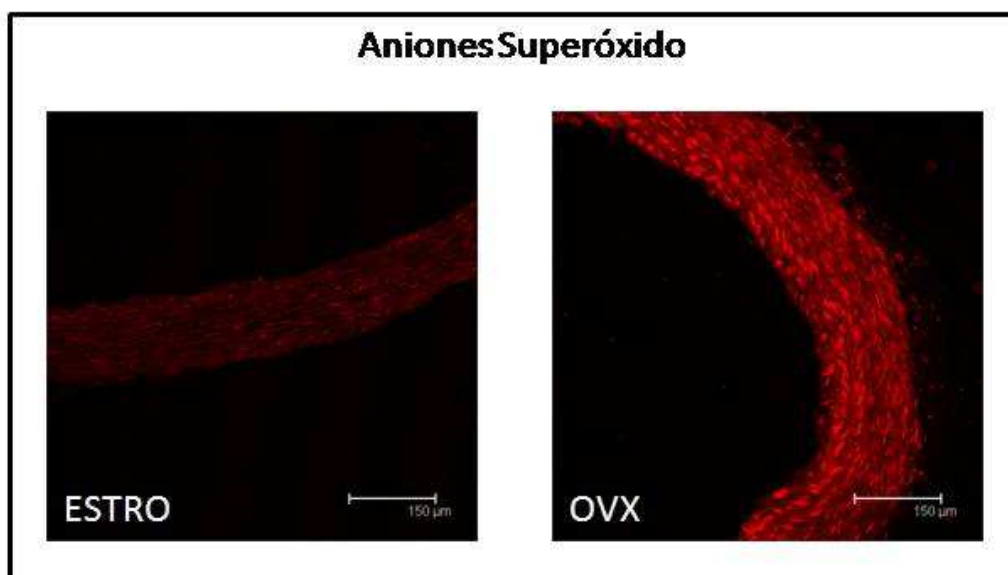


Figura 68: Detección *in situ* de aniones superóxido mediante microscopía confocal en segmentos aórticos procedentes de hembras control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) viejas. La figura es una imagen representativa de una sección arterial de cuatro segmentos de cada grupo magnificada 200x.

Observamos que este incremento provocado por la ovariectomía en la producción de O_2^- es mucho mayor en hembras viejas que en jóvenes, por lo tanto estos resultados ponen de manifiesto que el tiempo de mantenimiento de la ovariectomía es decisivo para la obtención de O_2^- . Así mismo, recordamos que en las aortas control, el envejecimiento no había modificado los niveles *in situ* de O_2^- gracias a una mayor actividad de la SOD. En este sentido y para entender el porqué encontramos estos valores tan elevados de O_2^- en ratas ovariectomizadas viejas, se analizó la expresión y actividad de las SODs.

3.2.- Expresión Cu/ZnSOD y MnSOD. Actividad de SOD

Al igual que hembras jóvenes, analizamos la expresión de las isoformas Cu/ZnSOD y MnSOD. La ovariectomía provocó un incremento en la expresión de Cu/Zn SOD y Mn SOD (Figura 69).

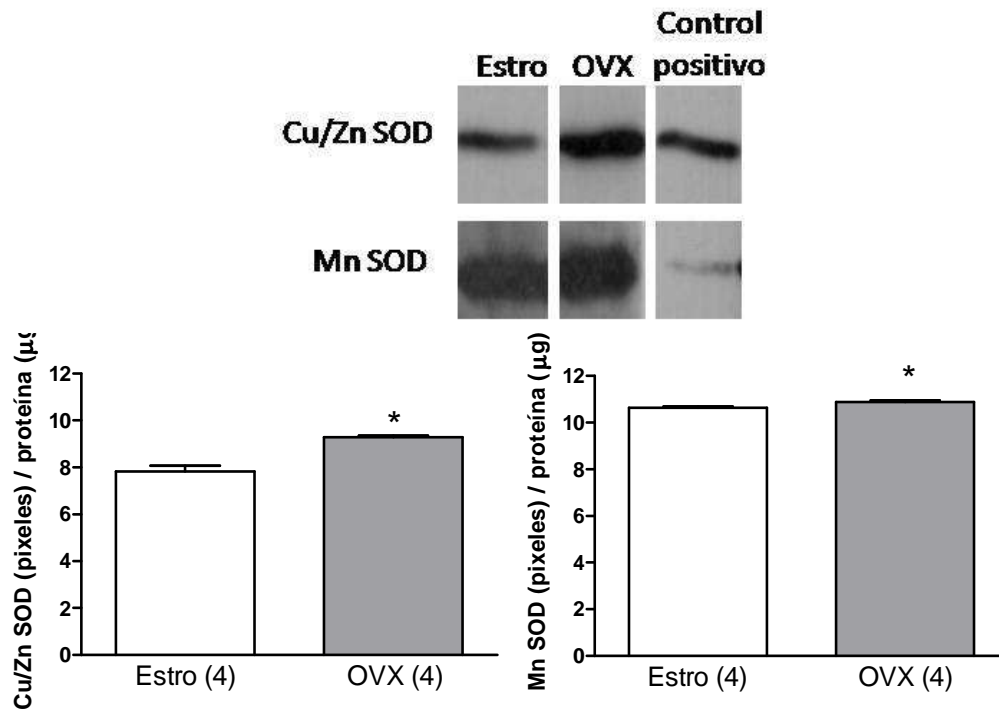


Figura 69: Resultados del análisis de la expresión de Cu/Zn SOD y Mn SOD mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de Cu/Zn SOD y Mn SOD. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de Cu/Zn SOD (izquierda) y Mn SOD (derecha) de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para Cu/Zn SOD y Mn SOD (píxeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 µg).* $p < 0.05$ frente a la situación control.

La ovariectomía en los segmentos procedentes de animales viejos no modificó la actividad de las isoformas de SOD (Figura 70).

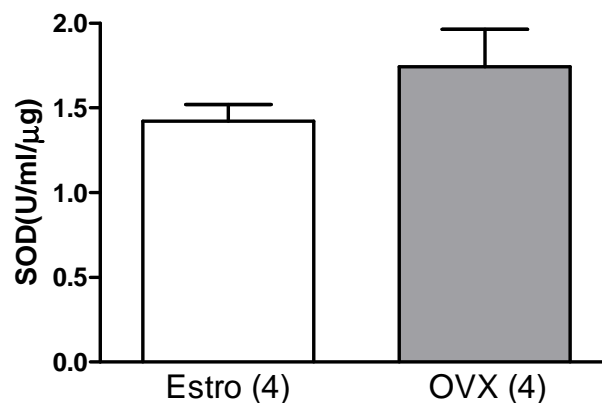


Figura 70: Actividad de la SOD en segmentos de aorta procedentes de animales control (fase Estro) y ovariectomizados (OVX) viejos. Los resultados (media \pm SEM) están expresados como unidades de SOD/ml por mg de proteína. El número de animales está indicado entre paréntesis.

Recordamos que en situación control el envejecimiento no modificó la expresión de Cu/ZnSOD, pero incremento la expresión de MnSOD y además de incrementar la actividad de SOD.

La ovariectomía en hembras viejas, pese a que incrementa la expresión de las isoformas Cu/ZnSOD y MnSOD, no modificó significativamente la actividad de la distintas isoformas de SOD. No debemos olvidar que partimos de una actividad ya incrementada por el envejecimiento y que en los segmentos procedentes de ratas ovariectomizadas viejas podemos apreciar la tendencia a incrementar la actividad de SOD. Esto podría explicar porqué encontramos en este grupo los niveles de O_2^- más elevados.

4.- Proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG)

Puesto que: (1) la ovariectomía en las ratas de 20 meses produce alteraciones en las vías de señalización del NO; (2) la función ovárica, en ratas jóvenes, regula la actividad de PKG, PKA y PKC; y (3) la PKG puede estar regulada por cAMP (Smith *et al*, 1996) y PKC (Barman *et al*, 2004^a; Barman *et al*, 2004^b; Hou *et al*, 2003), se analizó la actividad basal de las quinasa PKG, PKA y PKC.

La ovariectomía no modificó la actividad basal de PKG y disminuyó la actividad basal de PKA (Tabla 11). En el análisis de la actividad de PKC no se detectó señal en hembras viejas controles y ovariectomizadas, por lo que deducimos que en el envejecimiento la actividad basal de la de PKC esta disminuida en ambos grupos, aunque no podemos descartar la posibilidad de que existan diferencias entre las actividades.

	Estro (D.O./mg proteína)	OVX (D.O./mg proteína)	Número de datos
PKG	32.40 ± 3.71	27.17 ± 6.75	5
PKA	1359 ± 198.4	633.8 ± 121.8 #	4
PKC	-	-	6

Tabla 11: Actividades basales de las quinasas, PKG, PKA, PKC en segmentos de aorta procedentes de ratas hembras controles (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). Los valores están expresados (media ± SEM) como densidad óptica (D.O.)/mg proteína. # $p < 0.05$ frente a la situación control; - significa no detectada en el análisis.

El envejecimiento proporciona una regulación adicional sobre la actividad de las distintas quinasas. La actividad basal de PKG en hembras controles de 20 meses es mucho mayor que en hembras controles de 6 meses (Estro joven: 2.33 ± 0.33 D.O./mg proteína, N=5; Estro vieja: 32.40 ± 3.71 D.O./mg proteína, N=5, $p < 0.0001$) y por el contrario disminuye la actividad basal de PKA (Estro joven: 2961 ± 611.4 D.O./mg proteína, N=4; Estro vieja: 1359 ± 198.4 D.O./mg proteína, N=4) y PKC (Estro joven: 256.1 ± 89.50 D.O./mg proteína, N=6; Estro vieja: no detectada, N=6). El hecho de que el envejecimiento provoque una disminución en la actividad de PKC y PKA podría ser la causa de que la actividad de PKG sea tan elevada en las aortas de ratas viejas. Este resultado está de acuerdo con el efecto inhibitorio de la PKC sobre la PKG (Barman *et al*, 2004^a). El hecho de que en el envejecimiento la actividad de PKC esté disminuida podría provocar que desapareciera su efecto inhibitorio produciendo así, una mayor actividad de PKG.

En este sentido, estas diferencias pueden ser debidas a la disminución de los niveles de la hormonas sexuales que proporciona el envejecimiento, sin embargo, observamos que, al menos, en la regulación de la actividad basal de PKA, existe algo adicional que depende de la función ovárica que no son la estrona, 17β -estradiol y testosterona, pues los niveles de estas hormonas son iguales en situación control y ovariectomía en los animales de 20 meses de edad.

Una posible responsable de las diferencias en la actividad de PKA en todos los grupos experimentales podría ser la progesterona, pues las diferencias entre las actividades se correlacionan con las diferencias obtenidas de los niveles de progesterona en todos los grupos experimentales. Sin embargo, no ha sido descrito el papel vascular de la progesterona sobre la regulación de la actividad de PKA, aunque esto tampoco descarta su posible participación.

4.1.- Participación de PKG en la respuesta a ACh

Aunque la actividad basal de la PKG, no se ve modificada por la ovariectomía en segmentos de aorta de ratas viejas, no podemos descartar que su participación en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh sea diferente. Para ello se incubaron los segmentos procedentes de animales control y ovariectomizados con el inhibidor de la PKG, KT 5823.

La incubación con KT 5823 no modificó la relajación inducida por ACh, ni hembras viejas controles, ni ovariectomizadas (Figura 71).

Estos resultados, a pesar que la actividad de la PKG esté incrementada, son similares a lo observado en jóvenes y como hemos indicado en ese caso, podría suceder que estemos inhibiendo únicamente la actividad de la PKG mediada por cGMP (Taylor *et al*, 2000) y/o que el NO (Bolotina *et al*, 1994) y cGMP (Eichhorn y Dobrev, 2007; Roh *et al*, 2007) ejerciera su efecto por otras vías independientes de PKG.

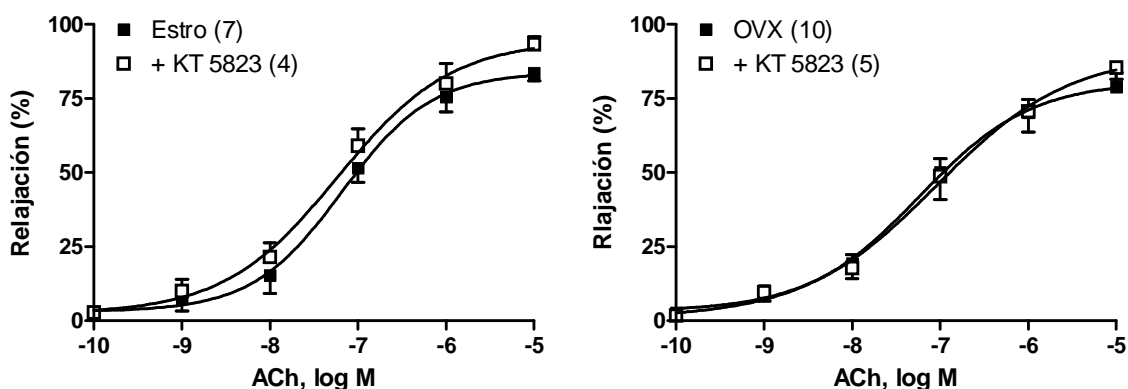


Figura 71: Efecto del KT 5823 (0.1 μ M) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0.1 nM- 10 μ M) en segmentos de aorta procedentes de hembras viejas controles (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como la porcentaje de inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 933.7 ± 39.47 mg, N=7; Estro + KT 5823: 1144 ± 253.4 mg, N=4; OVX: 1120 ± 79.48 mg, N=10; OVX + KT 5823: 1088 ± 60.81 mg, N=5). El número de animales está expresado entre paréntesis

4.2.- Participación de PKG en la liberación de NO endotelial

La incubación con el inhibidor de la PKG, el KT 5823 (1 μ M) no modificó la liberación basal e inducida por ACh en ninguno de los dos grupos (Figura 72).

En hembras jóvenes observábamos una regulación positiva de la liberación de NO mediante la PKG en respuesta a ACh, sin embargo no lo encontramos en los animales envejecidos. No debemos olvidar que la ovariectomía en ratas viejas disminuye la liberación de NO inducida por ACh en situación control, por lo que la liberación de NO en presencia de KT 5823 es menor que en ratas control.

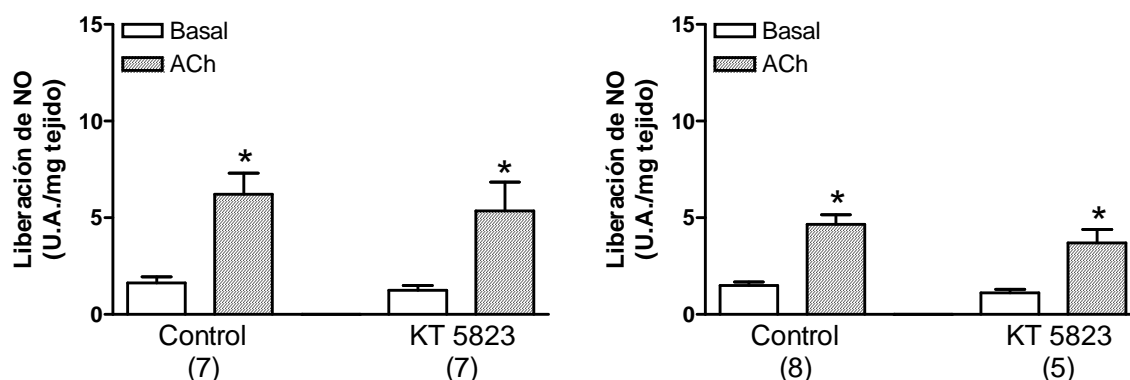


Figura 72: Efecto del KT 5823 (1 μ M) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh en los segmentos de aorta procedentes de animales control (izquierda) y ovariectomizados (derecha) precontraídos con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. * $p < 0,001$, frente a su correspondiente situación basal.

5.- Participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP}

La participación de los distintos canales de potasio en la regulación del tono vascular (Ko *et al*, 2008; Baranowska *et al*, 2007) está modulada por la acción de la PKG (White *et al*, 2000^a). Teniendo en cuenta que la actividad de la PKG basal está muy incrementada en el envejecimiento, sería interesante ver si la ovariectomía y el envejecimiento participan en la regulación de los canales. Para ello se analiza la expresión y participación en la respuesta inducida por ACh de los canales BK_{Ca} y K_{ATP}.

5.1.- Expresión de los canales BK_{Ca}

La ovariectomía no modificó la expresión de la subunidad α e incrementó la expresión de la subunidad β del canal BK_{Ca} (Figura 73).

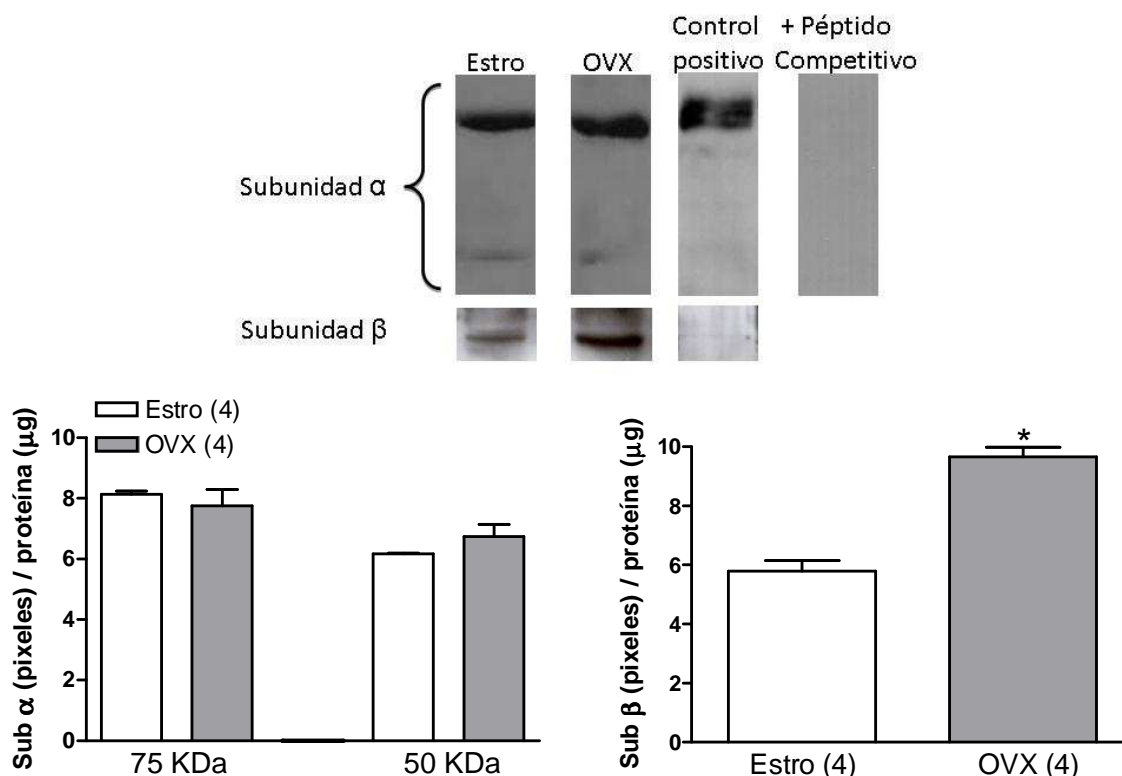


Figura 73: Resultados del análisis de la expresión de la subunidad (sub) α y β de los canales BK_{Ca} mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de la subunidad α y β de los canales BK_{Ca} . En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de la subunidad α del canal BK_{Ca} 75 y 50 KDa (izquierda) y la subunidad β del canal BK_{Ca} (derecha) de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para la subunidad α y β de los canales BK_{Ca} (píxeles) y la carga de proteína de cada segmento (20 μ g). * $p < 0.001$ frente a la situación control.

En hembras jóvenes habíamos indicado la existencia de una regulación hormonal sobre la expresión de la subunidad β , de tal manera que en ovariectomizadas jóvenes, donde la concentración de hormonas sexuales en suero es menor, la expresión de la subunidad β esta incrementada. En este sentido, podemos explicar que obtengamos una mayor expresión de la subunidad β en hembras viejas en comparación con hembras jóvenes (Estro joven: 3.78 ± 0.07 píxeles/ μ g, N=4; Estro vieja: 5.78 ± 0.37 píxeles/ μ g, N=4; $p < 0.01$). Sin embargo, con este razonamiento no podríamos explicar el incremento de expresión que obtenemos con la ovariectomía en hembras viejas, pues como ya hemos mencionado los niveles de distintas hormonas sexuales, a excepción de la progesterona se mantienen constantes en hembras controles y ovariectomizadas de 20 meses de edad, indicando que la

progesterona podría ejercer estos reguladores sobre la expresión de la subunidad β , sin descartar la existencia de otros factores adicionales.

Así mismo, el envejecimiento también regula la expresión de la subunidad α , pues provoca una disminución en la expresión de la banda 50 KDa (Estro joven: 7.46 ± 0.28 pixeles/ μ g, N=4; Estro vieja: 6.17 ± 0.02 pixeles/ μ g, N=4; $p < 0.01$), sin embargo esta la expresión de la subunidad α no parece estar sujeta a una regulación hormonal u ovárica adicional, pues en ningún caso está modificada a causa de la ovariectomía.

Adicionalmente, puesto que la subunidad β es la que confiere actividad al canal (Nimigean y Magleby, 1999), se analizará posteriormente el efecto de la ovariectomía en la participación de dicho canal en la respuesta vasomotora inducida a ACh.

5.2.- Expresión de los canales K_{ATP}

La ovariectomía en viejas no modificó la expresión de las subunidades kir6.1 y SUR2B del canal K_{ATP} (Figura 74).

Este resultado es similar al observado en jóvenes aunque haya sido descrito la regulación de los K_{ATP} por hormonas sexuales en otros tipos celulares y mediante administración exógena (Ranki *et al*, 2002; Park *et al*, 2008^a).

Adicionalmente, no hay que descartar que en nuestros resultados observamos que el envejecimiento provoca un incremento en la expresión de la subunidad SUR2B (Estro joven: 4.03 ± 0.04 pixeles/ μ g, N=4; Estro vieja: 4.53 ± 0.09 pixeles/ μ g, N=4; $p < 0.01$), la subunidad Kir6.1 no se ve modificada (Estro joven: 8.54 ± 0.11 pixeles/ μ g, N=4; Estro vieja: 8.39 ± 0.32 N=4, $p=0.66$).

Por otra parte, está descrito que la PKA activa directamente al canal a través de una fosforilación directa (Ser-1387) de la subunidad SUR2B (Shi *et al*, 2008), y como la actividad de PKA está modificada en el envejecimiento y por la ovariectomía se analizará a continuación la participación de estos canales en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh.

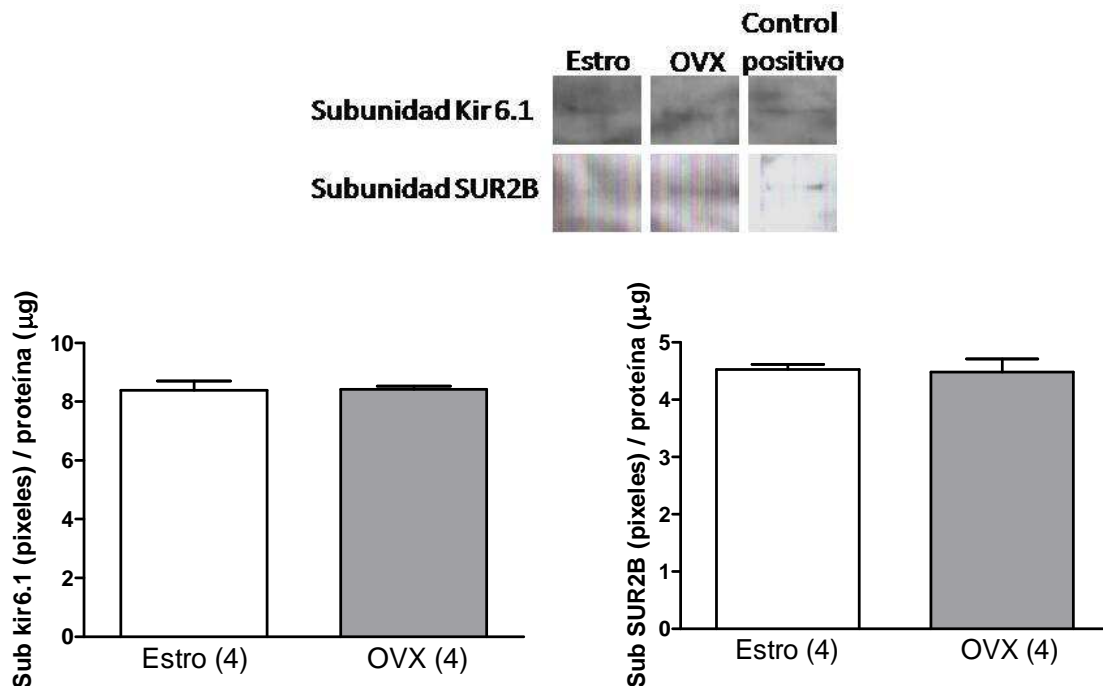


Figura 74: Resultados del análisis de la expresión de la subunidad (sub) Kir6.1 y SUR2B de K_{ATP} mediante la técnica de Western Blot en segmentos de aorta de ratas hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX). En la parte superior de la figura se representa un blot representativo de la expresión de la subunidad Kir6.1 y SUR2B de los canales K_{ATP} . En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión de la subunidad Kir6.1 del canal K_{ATP} (izquierda) y la subunidad SUR2B del canal K_{ATP} (derecha) de cuatro segmentos de cada grupo, valor escrito entre paréntesis. Los resultados (medias + SEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para la subunidad Kir6.1 y SUR2B de los canales K_{ATP} y la carga de proteína de cada segmento (20 µg).

5.3.- Participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} en la respuesta a ACh

Para analizar la participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} , se incubaron las aortas procedentes de ratas hembras viejas controles y ovariectomizadas con sus inhibidores específicos, Charibdotoxina y Glibenclamida, respectivamente. En los segmentos procedentes de animales control, la incubación con Glibenclamida (10 µM) disminuyó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, mientras que la Charibdotoxina (0.1 µM) no lo modificó (Figura 75). En segmentos procedentes de animales ovariectomizados, ni la incubación con Glibenclamida (10 µM), ni con Charibdotoxina (0.1 µM), modificaron la respuesta inducida a ACh (Figura 75).

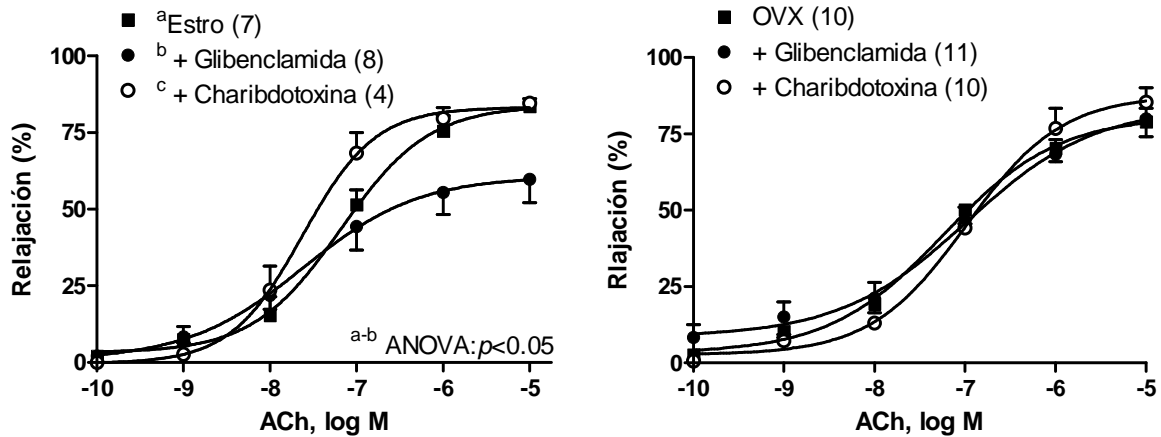


Figura 75: Efecto del Glibenclamida (10 μ M) y Charibdotoxina (0.1 μ M) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0.1 nM- 10 μ M) en segmentos de aorta procedentes de hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) están expresados como la porcentaje de inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 933.7 ± 39.47 mg, N=7; Estro + Glibenclamida: 1062 ± 114.8 mg, N= 8; Estro + Charibdotoxina: 816 ± 68.21 mg, N= 4; OVX: 1120 ± 79.48 mg, N=10; OVX + Glibenclamida: 863.3 ± 33.84 mg, N= 11; OVX + Charibdotoxina: 1316 ± 153.3 mg, N= 10). El número de animales está expresado entre paréntesis

La ovariectomía en los animales de 20 meses produce una respuesta similar a la observada en la ovariectomía en los animales de 6 meses, donde se aprecia que los canales BK_{Ca} y K_{ATP} no parecen tener un papel funcional en respuesta a ACh.

En situación control, encontramos una participación activa de los canales K_{ATP} , y la no participación de los canales BK_{Ca} , justo lo contrario de lo obtenido las aortas control de 6 meses. Así mismo, está descrito que a nivel endotelial la actividad de los K_{ATP} estimulan la liberación de NO endotelial al incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular y la actividad de la eNOS (Wang *et al*, 2007), lo cual puede estar de acuerdo con la disminución de la respuesta inducida por ACh incubación con Glibenclamida en los segmentos procedentes de animales control.

5.4.- Participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} en a respuesta a NPS

En los segmentos procedentes de animales control, la incubación con Glibenclamida (10 μ M) incrementó la respuesta vasodilatadora inducida por NPS y la Charibdotoxina (0.1 μ M) la disminuyó (Figura 76).

En segmento procedentes de animales ovariectomizados, la Glibenclamida (10 μ M) no modificó la respuesta inducida a NPS y la Charibdotoxina (0.1 μ M) la disminuyó (Figura 76).

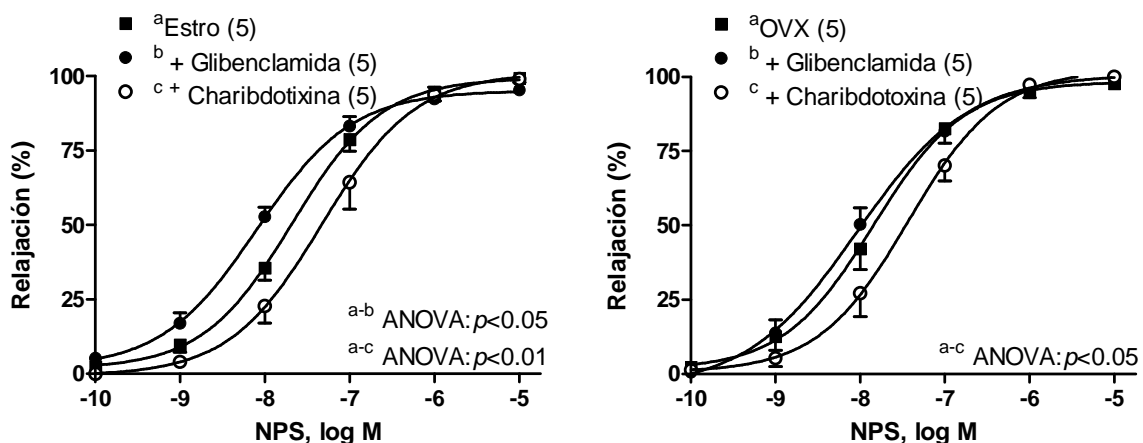


Figura 76: Efecto del Glibenclamida (10 μ M) y de la Charibdotoxina (0.1 μ M) sobre la vasodilatación inducida por NPS (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras viejas control (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídas con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 1101 \pm 180.7 mg, N=5; Estro + Glibenclamida: 1122 \pm 246.2 mg, N= 5; Estro + Charibdotoxina: 1656 \pm 192.6 mg, N=5; OVX: 1134 \pm 153.8 mg, N=5; OVX + Glibenclamida: 1017 \pm 163.3 mg, N= 5; OVX + Charibdotoxina: 1549 \pm 382.5 mg, N= 5). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

En la respuesta vasodilatadora al donante de NO, NPS, los canales BK_{Ca} están participando en ambos casos, como en los segmentos de hembras de 6 meses, lo cual nos hace suponer la existencia y participación de la cascada clásica de señalización NO/cGMP/PKG/ BK_{Ca} , sin embargo el papel funcional de los canales BK_{Ca} , no lo apreciamos en la respuesta a ACh, seguramente por la activación de otras cascadas dependientes de factores endoteliales que lo enmascaran.

Se ha descrito que la Glibenclamida provoca relajación en aorta de rata al incrementar la liberación de cGMP (Chan *et al*, 2000). Esto puede explicarnos porqué se observa una mayor respuesta a NPS en los segmentos procedentes

de animales control, sin embargo, los resultados de la respuesta inducida por ACh son diferentes, seguramente porque la estimulación con ACh provoca la liberación de otras sustancia vasoactivas que están participando en la regulación de dichos canales y tampoco podemos descartar la participación de los canales de potasio, sobre la liberación de NO.

5.5.- Participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} en la liberación de NO endotelial

En los animales control la incubación con Glibenclamida (10 μ M) no modificó la liberación basal de NO endotelial, sin embargo disminuyó la estimulada con ACh y Charibdotoxina (0.1 μ M) no modificó ni la liberación basal, ni la inducida por ACh (Figura 77).

En animales ovariectomizados, la liberación de NO basal e inducida por ACh se disminuyó por la Glibenclamida (10 μ M) y no se modificó por la Charibdotoxina (0.1 μ M) (Figura 77).

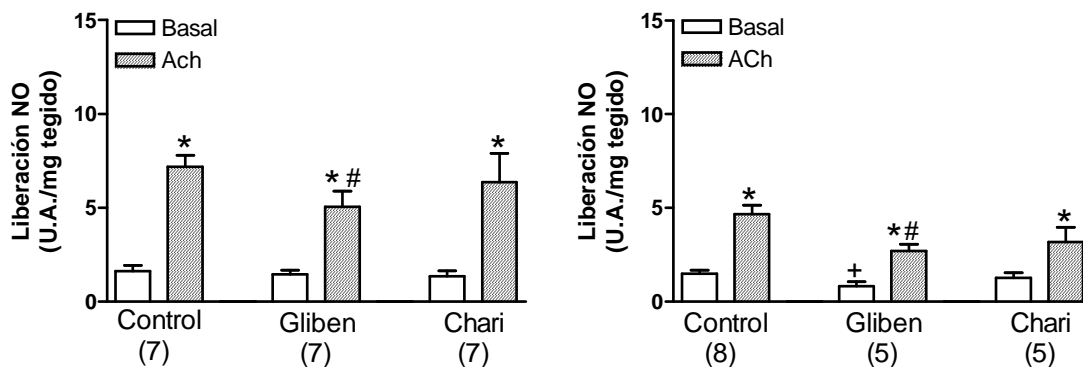


Figura 77: Efecto del Glibenclamida (Gliben, 10 μ M) y Charibdotoxina (Cahri, 0.1 μ M) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh en segmentos de aorta procedentes de ratas hembras control (izquierda) y ovariectomizadas (derecha) precontraídas con NA (0.1 μ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. * $p < 0.001$, frente a su correspondiente situación basal; # $p < 0.05$, frente a la situación control estimulada con ACh; + $p < 0.05$ frente a la situación control basal.

Está descrito que la activación de los K_{ATP} endoteliales incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} y la liberación de NO endotelial (Wang *et al*, 2007), estos datos explicarían la disminución en la liberación de NO endotelial que observamos en los resultados, sin embargo, esta regulación de los canales

K_{ATP} sobre la liberación de NO basal e inducida por ACh en ovariectomizadas viejas no lo observamos en las ovariectomizadas jóvenes, lo que puede ser debido a la sobreestimulación de la eNOS por derivados de COX-2 que sólo se produce en ratas ovariectomizadas (Martorell *et al*, 2009) y que dicha regulación se vea modificada por el envejecimiento.

5.5.- Reactividad vascular al abridor de canales BK_{Ca} . Participación de la PKG

Puesto que hemos observado la participación de los canales BK_{Ca} en el efecto del NO en su respuesta sobre el músculo liso vascular y la existencia de una regulación adicional por el envejecimiento y una posible regulación hormonal de la expresión de los BK_{Ca} se analizó la respuesta al abridor de canales BK_{Ca} , NS 1619.

La ovariectomía no modificó la relajación inducida por el abridor de los canales BK_{Ca} , NS 1619 (0,1 nM -10 μ M) en los segmentos aórticos precontraídos con 0.1 μ M NA. En ambos casos la incubación de KT 5823 incrementó la respuesta vasodilatadora inducida por NS 1619 (Figura 78).

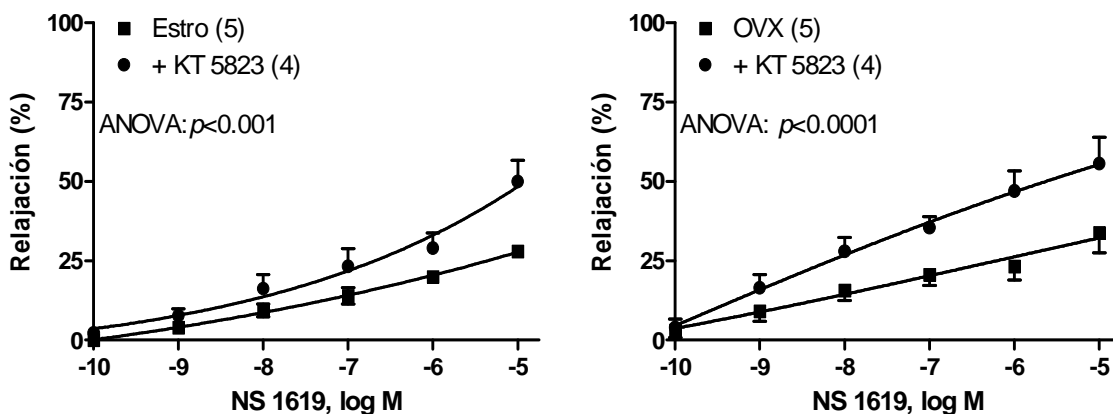


Figura 78: Efecto del KT 5823 (1 μ M sobre la vasodilatación inducida por NS 1619 (0,1 nM -10 μ M) en segmentos de aorta de hembras viejas controles (fase Estro) y ovariectomizadas (OVX) precontraídos con NA (0.1 μ M). Los resultados (media \pm SEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por NA (Estro: 904.3 \pm 43.12 mg, N=5; Estro + KT 5823: 1019 \pm 81.02 mg, N= 4; OVX: 1103 \pm 84.65 mg, N=5; OVX + KT 5823: 1063 \pm 71.08 mg, N=4). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

Adicionalmente, obtenemos que la respuesta al abridor de canales BK_{Ca} , NS 1619, es mayor en hembras jóvenes que en viejas ($p < 0.05$). Este resultado concuerda con los datos obtenidos del análisis de Western Blot, en el que observamos una menor expresión de la subunidad α en hembras viejas, dando a entender que existen menos canales, independientemente que la subunidad β , que es la que da actividad al canal este incrementada.

La respuesta a NS 1619 con KT 5823 sugiere que la PKG ejerce una regulación negativa sobre el canal, tanto en las aortas de animales control, como de ratas ovariectomizadas.

Recordamos que en hembras jóvenes, la PKG regula positivamente la actividad de los BK_{Ca} en ovariectomía, de acuerdo con la mayor actividad de PKG en estos animales. En el envejecimiento tenemos que la actividad basal de la PKG está todavía más incrementada en las dos situaciones (control y ovariectomía) y sin embargo, al bloquear la actividad de la PKG, se incrementa la respuesta al abridor de los canales BK_{Ca} . No existen datos bibliográficos que describan una regulación negativa de los canales BK_{Ca} por PKG, lo que indicaría la implicación de otras cascadas de señalización en la actividad del canal cuando la PKG está inhibida (Figura 79).

No podemos descartar que el NO (Bolotina *et al*, 1994), el cGMP (Eichhorn y Dobrev, 2007) y la PKA (Roh *et al*, 2007) activen el canal BK_{Ca} cuando la PKG está bloqueada, pero tampoco la existencia de que de otras quinasas o los O_2^- participen en dicha regulación (Figura 79). Por tanto esta hipótesis será el objetivo de los próximos trabajos.

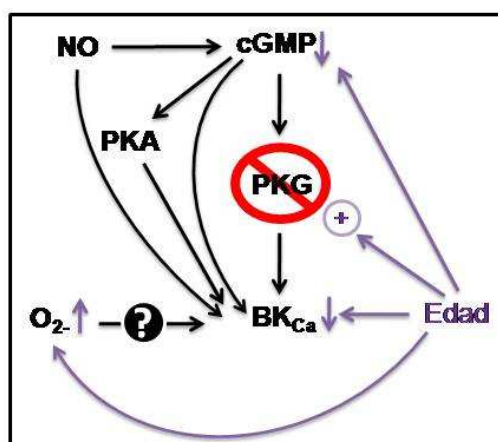


Figura 79: Representación esquemática de la regulación de los canales BK_{Ca} en aortas de rata en el envejecimiento.

En resumen, en aortas procedentes de de ratas hembra con la función ovárica intacta, el envejecimiento no modifica la liberación de NO y disminuye la formación de cGMP; sin embargo la respuesta vasodilatadora inducida por ACh está disminuida a pesar de que la actividad de PKG es muy superior a la observada en ratas jóvenes. También modifica la participación de los canales BK_{Ca} y K_{ATP} en la respuesta vasodilatadora inducida a ACh, de tal forma que disminuye la expresión y el efecto vasodilatador de los canales BK_{Ca} y aumenta el de los canales K_{ATP} .

La pérdida de función ovárica mantenida hasta esta edad causa una disminución en la liberación de NO y un aumento en la producción de O_2^- , aunque también la expresión y actividad de las SOD parecen están incrementadas. Sin embargo no existe modificación sobre los niveles de cGMP y actividad de PKG manteniéndose la respuesta vasodilatadora inducida por ACh.

Conclusiones

-
- I. La ovariectomía en hembras jóvenes provoca:
- i) Disminución en los niveles séricos de estrona, 17β -estradiol, testosterona y progesterona.
 - ii) Mantenimiento de la respuesta vasodilatadora inducida a ACh, aunque:
 - Incrementa la producción de O_2^- , la expresión de Cu/ZnSOD y MnSOD y la actividad de las SODs;
 - No modifica la expresión de eNOS, ni la liberación y función del NO endotelial;
 - Disminuya la formación de cGMP;
 - Aumenta la actividad de PKG;
 - Elimina la regulación positiva de la PKG sobre la liberación de NO endotelial;
 - iii) Regulación de la función de los canales BK_{Ca} , ya que:
 - Incrementa la expresión de la subunidad β de los canales BK_{Ca} ;
 - Incrementa la actividad de los canales BK_{Ca} por la acción de la PKG;
 - iv) Mantenimiento de la expresión y la participación de los canales K_{ATP} en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, pero provoca la eliminación de la regulación positiva de los canales K_{ATP} en la liberación de NO endotelial.
- II. El envejecimiento en ratas hembra con la función ovárica intacta provoca:
- i) Disminución en los niveles séricos de estrona, 17β -estradiol, testosterona y progesterona.
 - ii) Disminución de la relajación inducida por ACh, aunque:
 - No modifica la producción de O_2^- , ni la expresión de Cu/ZnSOD, pero incrementa la expresión de MnSOD y la actividad de las SODs;
 - No modifica la expresión de eNOS, ni la liberación de NO endotelial;
 - Disminuya la formación de cGMP;
 - Incrementa la actividad de la PKG (incremento superior al que provoca la ovariectomía en jóvenes);

- Elimina la regulación positiva de la PKG sobre la liberación de NO endotelial;
 - iii) Disminución de la expresión de la subunidad α de los canales BK_{Ca} y su participación en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh.
 - iv) Incremento de la expresión de la subunidad SUR2B los canales K_{ATP} y su participación en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, mientras que la regulación positiva de estos canales sobre la liberación de NO endotelial se mantiene.
- III. La ovariectomía en el envejecimiento provoca:
- i) Disminución los niveles séricos de la progesterona, mientras que mantiene la disminución en los niveles de estrona, 17β -estradiol y testosterona producidos por el envejecimiento.
 - ii) Mantenimiento de la respuesta inducida por ACh, ya disminuida por el envejecimiento, aunque:
 - Incrementa la producción de O_2^- , la expresión de Cu/ZnSOD y MnSOD y la actividad de las SODs;
 - Disminuye la liberación de NO endotelial, si altera la expresión de eNOS;
 - Mantiene la disminución en la formación de cGMP;
 - Mantiene el incremento de la actividad de PKG;
 - Mantiene la ausencia de la regulación positiva de la PKG sobre la liberación del NO endotelial.
 - iii) Mantenimiento de la disminución de la expresión de la subunidad α e incrementa la expresión de la subunidad β de los canales BK_{Ca} ; su participación en la respuesta inducida por ACh no se modifica.
 - iv) Abolición de la participación de los canales K_{ATP} en la respuesta inducida por ACh, sin modificar su expresión, ni la regulación positiva de los canales K_{ATP} sobre la liberación de NO endotelial.

Globalmente, estos resultados muestran la complejidad e interacciones entre los elementos de una vía de señalización particular, sin olvidar las posibles interacciones con otras vías de señalización.

Los resultados también indican que alteraciones en un determinado punto de la vía de transducción de señales pueden desarrollar diferentes mecanismos compensatorios para intentar mantener la función vascular.

Bibliografía

- Abid MR, Kachra Z, Spokes KC, Aird WC. NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Lett.* 2000; 486: 252-256.
- Aikawa K, Sugino T, Matsumoto S, Chichester P, Whitbeck C, Levin RM. The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology. *J Urol*, 2003; 170: 634-637.
- Alberts B, Bry D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. Ed. Omega 2^a Ed. 1992
- Aldreton WK., Cooper CE, Knowles R. Nitric Oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357: 593-615. Review
- Andrawis N, Jones DS, Abernethy DR. Aging is associated with endothelial dysfunction in the human forearm vasculature. *J Am Geriatr Soc.* 2000; 48:193-198.
- Andreopoulos S, Papapetropoulos A. Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation. *Gen Pharmacol.* 2000; 34: 147-157. Review.
- Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science.* 1991; 253: 551-555.
- Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1989; 13: 859-864.
- Ayres S, Abplanalp W, Liu JH, Subbiah MTR. Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 β on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J Physiol* 1998; 274: 1002-1008.
- Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J. A view of sur/KIR6.X, K_{ATP} channels. *Annu Rev Physiol.* 1998; 60: 667-687. Review.
- Baranowska M, Kozłowska H, Korbut A, Malinowska B. Potassium channels in blood vessels: their role in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007; 61: 596-605. Review.
- Barder DA, Miller VM. Gender differences in endothelium-dependent relaxations do not involve NO in porcine coronary arteries. *Am J Physiol* 1997; 273: 2325-2332.
- Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BK_{Ca} channel activity. *Am J Physiol.* 1998; 275: 1283-1289.
- Barman SA, Zhu S, Han G, White RE. cAMP activates BK_{Ca} channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284: 1004-1011.
- Barman^a SA, Zhu S, White RE. Protein kinase C inhibits BK_{Ca} channel activity in pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286: 149-155.
- Barman^b SA, Zhu S, White RE. PKC activates BK_{Ca} channels in rat pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286: 1275-1281.
- Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Lüscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension.* 1997; 30: 817-824.

- Baumbach GL, Didion SP, Faraci FM. Hypertrophy of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for CuZn superoxide dismutase. *Stroke*. 2006; 37: 1850-1855.
- Beall A, Bagwell D, Woodrum D, Stoming TA, Kato K, Suzuki A, Rasmussen H, Brophy CM. The small heat shock-related protein, HSP20, is phosphorylated on serine 16 during cyclic nucleotide-dependent relaxation. *J Biol Chem*. 1999; 274: 11344-11351.
- Bechara LR, Tanaka LY, Santos AM, Jordão CP, Sousa LG, Bartholomeu T, Ramires PR. A single bout of moderate-intensity exercise increases vascular NO bioavailability and attenuates adrenergic receptor-dependent and -independent vasoconstrictor response in rat aorta. *J Smooth Muscle Res*. 2008; 44: 101-111.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1990; 87: 1620-1624.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271: 1424-1437. Review.
- Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*. 1997; 51: 535-541.
- Blanco-Rivero J, Balfagón G, Ferrer M. Male castration increases neuronal nitric oxide synthase activity in the rat mesenteric artery through protein kinase C activation. *J Vasc Res*. 2005; 42: 526-534.
- Blanco-Rivero J, Sagredo A, Balfagón G, Ferrer M. Orchidectomy increases expression and activity of Cu/Zn-superoxide dismutase, while decreasing endothelial nitric oxide bioavailability. *J Endocrinol*. 2006; 190: 771-778.
- Blanco-Rivero J, Sagredo A, Balfagón G, Ferrer M. Protein kinase C activation increases endothelial nitric oxide release in mesenteric arteries from orchidectomized rats. *J Endocrinol*. 2007; 192: 189-197.
- Blough ER, Rice KM, Desai DH, Wehner P, Wright GL. Aging alters mechanical and contractile properties of the Fisher 344/Nnia X Norway/Binia rat aorta. *Biogerontology*. 2007; 8: 303-313.
- Boeckxstaens GE, Pelckmans PA. Nitric oxide and the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. *Comp Biochem Physiol*. 1997; 118: 925-937.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994; 368: 850-853.
- Brakemeier S, Eichler I, Knorr A, Fassheber T, Köhler R, Hoyer J. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney Int*. 2003; 64: 199-207.
- Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2005;25: 155-162.

- Brophy CM, Dickinson M, Woodrum D. Phosphorylation of the small heat shock-related protein, HSP20, in vascular smooth muscles is associated with changes in the macromolecular associations of HSP20. *J Biol Chem*. 1999; 274: 6324-6329.
- Brzezinska AK, Gebremedhin D, Chilian WM, Kalyanaraman B, Elliott SJ. Peroxynitrite reversibly inhibits Ca(2+)-activated K(+) channels in rat cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 278: 1883-1890.
- Bülbring E, Tomita T. Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol*. 1987; 39: 49-95.
- Buñag RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol*. 1973; 34: 279-282.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Biol*. 2000; 87: 840-844.
- Calderone V, Baragatti B, Breschi MC, Nieri P, Martinotti E. Hormonal influence on the release of endothelial nitric oxide: gender-related dimorphic sensitivity of rat aorta for noradrenaline. *J Pharm Pharmacol*. 2002; 54: 523-528.
- Calderone V. Large-conductance, ca(2+)-activated k(+) channels: function, pharmacology and drugs. *Curr Med Chem*. 2002; 9: 1385-1395. Review.
- Castillo C, Ariznavarreta MC, Lahera V, Cachafeiro V, Gil-Loyzaga P, Tresguerres JA. Effects of ovariectomy and growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old female rats. *Biogerontology*. 2005; 6:49-60
- Castillo C, Cruzado M, Ariznavarreta C, Gil-Loyzaga P, Lahera V, Cachafeiro V, Tresguerres JA. Body composition and vascular effects of growth hormone administration in old female rats. *Exp Gerontol*. 2003; 38: 971-979.
- Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, González-Fernández F, Millás I, Montón M, Rodrigo J, Rico L, Fernández P, de Frutos T, Rodríguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, López-Farré. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res*. 1998; 83: 279-286.
- Chakrabarti S, Lekontseva O, Davidge ST. Estrogen is a modulator of vascular inflammation. *IUBMB Life*. 2008; 60: 376-382.
- Chan W, Yao X, Ko W, Huang Y. Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta. *Cardiovasc Res*. 2000; 46: 180-187.
- Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 1999; 37: 949-962.
- Chen L, Daum G, Fischer JW, Hawkins S, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Clowes AW. Loss of expression of the beta subunit of soluble guanylyl cyclase prevents nitric oxide-mediated inhibition of DNA synthesis in smooth muscle cells of old rats. *Circ Res*. 2000; 86: 520-525.
- Cheng DY, Feng CJ, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Effects of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in female rat aorta. *Life Sci* 1994; 55: 187-191.

- Cherry PD, Omar HA, Farrell KA, Stuart JS, Wolin MS. Superoxide anion inhibits cGMP-associated bovine pulmonary arterial relaxation. *Am J Physiol*. 1990; 259: 1056-1062.
- Choi SB, Jang JS, Park S. Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology*, 2005; 146: 4786-4794.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*. 1998; 31: 643-648.
- Chrissobolis S, Ziogas J, Chu Y, Faraci FM, Sobey CG. Role of inwardly rectifying K(+) channels in K(+)-induced cerebral vasodilatation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279: 2704-2712.
- Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of store-operated Ca^{2+} influx. *Circ Res*. 1999; 84: 210-219.
- Conde MV, Marín J, Fernandez-Criado C, Balfagón G. Regulation of beta-adrenoceptor-mediated relaxation of the rat aorta is modulated by endogenous ovarian hormones. *Clin Sci (Lond)*. 2000; 98: 381-387.
- Conrad KP, Mosher MD, Brinck-Johnsen T, Colpoys MC. Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on pressor responses in conscious ovariectomized rats. *Am J Physiol*. 1994; 266: 1267-1272.
- Cornwell TL, Li J, Sellak H, de Lanerolle P, Rodgers WH, Miller RT, Word RA. Regulation of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in human uterine tissues during the menstrual cycle. *Biol Reprod*. 2001; 64: 857-864.
- Cox RH, Petrou S. $\text{Ca}(2+)$ influx inhibits voltage-dependent and augments $\text{Ca}(2+)$ -dependent K(+) currents in arterial myocytes. *Am J Physiol*. 1999; 277: 51-63.
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 773-781. Review.
- Darkow DJ, Lu L, White RE. Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am J Physiol*. 1997; 272: 2765-2773.
- Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. 1995; 75: 519-560.
- Demolombe S, Escande D. ATP-binding cassette proteins as targets for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci* 1996; 17: 273-275.
- Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985; 61: 564-570.
- DiChiara TJ, Reinhart PH. Redox modulation of hsl Ca^{2+} -activated K^+ channels. *J Neurosci*. 1997; 17: 4942-4955.
- Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res*. 2002; 91: 938-944.
- Dillon PF, Aksoy MO, Driska SP, Murphy RA. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science*. 1981; 211: 495-498.

- Dong DL, Yue P, Yang BF, Wang WH. Hydrogen peroxide stimulates the Ca(2+)-activated big-conductance K channels (BK) through cGMP signaling pathway in cultured human endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*. 2008; 22: 119-126.
- Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosselli M, Jackson EK, Keller PJ. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999; 33: 177-182.
- Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Rosselli M, Keller PJ, Jackson EK. Estradiol inhibits smooth muscle cell growth in part by activating the cAMP-adenosine pathway. *Hypertension*. 2000; 35: 262-266.
- Eichhorn B, Dobrev D. Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: functional role and therapeutic potential. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2007; 376: 145-155.
- Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003; 81: 1013-1028. Review.
- El-Mowafy AM, Alkhalaf M, Jaffal SM. Nongenomic activation of the GC-A enzyme by resveratrol and estradiol downstream from membrane estrogen receptors in human coronary arterial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007; 17: 508-516.
- Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; 24: 1367-1373.
- Ferrer M, Alonso MJ, Salaices M, Marin J, Balfagon G. Increase in neurogenic nitric oxide metabolism by endothelin-1 in mesenteric arteries from hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 36: 541-547.
- Ferrer M, Balfagon G. Aging alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries: role of presynaptic beta-adrenoceptors. *Clin Sci* 2001; 101: 321-328.
- Ferrer M, Meyer M, Osol G. Estrogen replacement increases beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric arteries. *J Vasc Res*, 1996; 33: 124-131.
- Ferrer M, Osol G. Estrogen replacement modulates resistance artery smooth muscle and endothelial alpha2-adrenoceptor reactivity. *Endothelium*. 1998; 6: 133-141.
- Ferrer M, Sanchez M, Minoves N, Salaices M, Balfagon G. Aging increases neuronal nitric oxide release and superoxide anion generation in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 2003; 40: 509-519.
- Ferrer M, Tejera N, Marín J, Balfagón G. Androgen deprivation facilitates acetylcholine-induced relaxation by superoxide anion generation. *Clin Sci (Lond)*. 1999; 97: 625-631.
- Ferrer M, Tejera N, Marín J, Balfagón G. Effect of age on the vasorelaxation elicited by cromakalim. Role of K⁺ channels and cyclic GMP. *Life Sci*. 1998; 63: 2071-2078.
- Figard H, Gaume V, Mougin F, Demougeot C, Berthelot A. Beneficial effects of isometric strength training on endothelial dysfunction in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006; 31: 621-630.

- Filippov G, Bloch DB, Bloch KD. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1997; 100: 942-948.
- Fleming I, Gray GA, Schott C, Stoclet JC. Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 6: 375-376.
- Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Benjamin N, Ritter JM. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension.* 1998; 32: 730-734.
- Fraile ML, Conde MV, Sanz L, Moreno MJ, Marco EJ, López de Pablo AL. Different influence of superoxide anions and hydrogen peroxide on endothelial function of isolated cat cerebral and pulmonary arteries. *Gen Pharmacol.* 1994; 25: 1197-1205.
- Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997; 272: 18515-18517. Review.
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1631-1639.
- Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BK_{Ca} channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem.* 1999; 274: 10927-10935.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376.
- Gao M, Xue H, Wang Y, Wang H. Iptakalim, opener of K(ATP), reverses the enhanced expression of genes encoding K(ATP) subunits in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 2005; 77: 2743-2751.
- Geiselhöringer A, Gaisa M, Hofmann F, Schlossmann J. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett.* 2004; 575:19-22.
- Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet.* 1994; 7: 34-39.
- Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1585-1590.
- Ghanam K, Javellaud J, Ea-Kim L, Oudart N. The protective effect of 17b-estradiol on vasomotor responses of aorta from cholesterol-fed rabbit is reduced by inhibitors of superoxide dismutase and catalase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249: 858-864.
- Gil-Longo J, González-Vázquez C. Characterization of four different effects elicited by H_2O_2 in rat aorta. *Vascul Pharmacol.* 2005; 43: 128-138.
- Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte PM. Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 244: 19-22.

- Gonzales RJ, Walker BR, Kanagy NL. 17beta-estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: 555-564.
- Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Volumen II, 9ª Edición. Editorial MacGraw-Hill. Interamericana. 1996
- Gorodeski GI. Role of nitric oxide and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in the estrogen regulation of cervical epithelial permeability. *Endocrinology*. 2000; 141: 1658-1666.
- Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2001; 280: 193-206.
- Gribble FM, Reimann F. Pharmacological modulation of K(ATP) channels. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30: 333-339. Review.
- Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1986; 320: 454-456.
- Gupte S, Rupawalla BA, Mohazzab-H KM, Wolin MS. Regulation of NO-elicited pulmonary artery relaxation and guanylate cyclase activation by NADH oxidase and SOD. *Am J Physiol*. 1999; 276: 1535-1542.
- Gutterman DD, Miura H, Liu Y. Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 671-678. Review.
- Guyton y Hall. Tratado de Fisiología Médica, 11ª Edición. Editorial Elsevier Saunders. 2007
- Haml V, Huang JM, Weir EK, Archer SL. Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol Res*. 1995; 44: 39-44.
- Harman D. Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 928: 1-21.
- Harrison-Bernard LM, Raj L. Postmenopausal hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2000; 2: 202-207.
- Hashimoto M, Gamoh S, Hossain S, Okunishi H, Shimoura K, Yasui Y, Ando A, Masumura S. Age-related changes in aortic sensitivity to noradrenaline and acetylcholine in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998; 25: 676-681.
- Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y. Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Heart Vessels*. 1998; 13: 9-17.
- Hayabuchi Y, Standen NB, Davies NW. Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated $K(+)$ channels of rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281: 2480-2489.
- Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11259-11263.
- Heil WG, Landgraf W, Hofmann F. A catalytically active fragment of cGMP-dependent protein kinase. Occupation of its cGMP-binding sites does not affect its phosphotransferase activity. *Eur J Biochem*. 1987; 168: 117-121.

- Heymsfield SB, Gallagher D, Poehlman ET, Wolper C, Nonas K, Nelson D, Wang ZM. Menopausal changes in body composition and energy expenditure. *Exp Gerontol*. 1994; 29: 377-389.
- Hibino M, Okumura K, Iwama Y, Mokuno S, Osanai H, Matsui H, Toki Y, Ito T. Oxygen-derived free radical-induced vasoconstriction by thromboxane A₂ in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 33: 605-610.
- Higgins CF. The ABC of channel regulation. *Cell* 1995; 82: 693-696.
- Hisamoto K, Bender JR. Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids*. 2005; 70: 382-387.
- Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett*. 1995; 360: 291-293.
- Hobbs AL, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39: 191-220.
- Hou Y, Lascola J, Dulin NO, Ye RD, Browning DD. Activation of cGMP-dependent protein kinase by protein kinase C. *J Biol Chem*. 2003; 278: 16706-16712.
- Huang QQ, Fisher SA, Brozovich FV. Unzipping the role of myosin light chain phosphatase in smooth muscle cell relaxation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 597-603.
- Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA Jr, Schraufstätter IU, Sauerheber RD, Spragg RG, Jackson JH, Cochrane CG. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1988; 263: 1665-1675.
- Ichinari K, Kakei M, Matsuoka T, Nakashima H, Tanaka H. Direct activation of the ATP-sensitive potassium channel by oxygen free radicals in guinea-pig ventricular cells: its potentiation by MgADP. *J Mol Cell Cardiol*. 1996; 28: 1867-1877.
- Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H₂O₂. *Am J Physiol*. 1999; 277: 978-985.
- Ignarro L, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in the vascular smooth muscle relaxation. *Ann. Rev. Pharmacol*. 1985; 25: 171.
- Ignarro LJ, Adams JB, Horwitz PM, Wood KS. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J Biol Chem*. 1986; 261: 4997-5002.
- Ignarro^a LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1987; 84: 9265-9269.
- Ignarro^b LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res*. 1987; 61: 866-879.

- Jensen BS, Strøbaek D, Olesen SP, Christophersen P. The Ca^{2+} -activated K^+ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets*. 2001; 2: 401-422. Review.
- Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol*. 1991; 104: 1033-1037.
- Jiang Z, Wallner M, Meera P, Toro L. Human and rodent MaxiK channel beta-subunit genes: cloning and characterization. *Genomics*. 1999; 55: 57-67.
- Jones PM, George AM. Subunit interactions in ABC transporters: Towards a functional architecture. *FEMS. Microbiol Lett* 1999; 179: 187-202.
- Jun SS, Chen Z, Pace MC, Shaul PW. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest*. 1998; 102: 176-183.
- Kähönen M, Tolvanen JP, Sallinen K, Wu X, Pörsti I. Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am J Physiol*. 1998; 275: 15-22.
- Kalantaridou SN, Naka KK, Bechlioulis A, Makrigiannakis A, Michalis L, Chrousos GP. Premature ovarian failure, endothelial dysfunction and estrogen-progestogen replacement. *Trends Endocrinol Metab*. 2006; 17: 101-109. Review.
- Kanashiro CA, Khalil RA. Gender-related distinctions in protein kinase C activity in rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280: 34-45.
- Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys*. 1991; 289: 130-136.
- Kawahara S, Umemoto S, Tanaka M, Umeji K, Matsuda S, Kubo M, Matsuzaki M. Up-regulation of Akt and eNOS induces vascular smooth muscle cell differentiation in hypertension in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005; 45: 367-374.
- Kinke G.J. The laboratory rat. *The Handbook of experimental animals*. 1ª edición. Editorial Academic Press, 2000
- Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutase in the Lung and Human Lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 167: 1600-1619.
- Kinoshita H, Azma T, Nakahata K, Iranami H, Kimoto Y, Dojo M, Yuge O, Hatano Y. Inhibitory effect of high concentration of glucose on relaxations to activation of ATP-sensitive K^+ channels in human omental artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 2290-2295.
- Knot HJ, Lounsbury KM, Brayden JE, Nelson MT. Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca^{2+} and eNOS activity. *Am J Physiol*. 1999; 276: 961-969.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*. 2008; 44: 65-81. Review.
- Kobayashi S, Inoue N, Azumi H, Seno T, Hirata K, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokozaki H, Yokoyama M. Expressional changes of the vascular antioxidant system in atherosclerotic coronary arteries. *J Atheroscler Thromb*. 2002; 9: 184-190.

- Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem.* 1996; 271: 21933-21938.
- Korovkina VP, England SK. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29: 317-323. Review.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 509-526.
- Kurachi Y. ATP-sensitive K^+ channels of cardiovascular system. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1998; 112: 32-35.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- Lam KK, Lee YM, Hsiao G, Chen SY, Yen MH. Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. *Menopause.* 2006; 13: 294-302.
- Landahl S, Bengtsson C, Sigurdsson JA, Svanborg A, Svärdsudd K. Age-related changes in blood pressure. *Hypertension.* 1986; 8: 1044-1049.
- Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis.* 2001; 12: 455-461.
- Lang MG, Noll G, Lücher, TF. Effect of aging and hypertension on contractility of resistance arteries: Modulation by endothelial factors. *Am J Physiol.* 1995; 269: 837-844.
- Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285: 277-297. Review
- Latour MG, Shinoda M, Lavoie JM. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol.* 2001; 90: 235-241
- Lemieux C, Picard F, Labrie F, Richard D, Deshaies Y. The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. *Obes. Res.* 2003; 11: 477-490.
- Leung SW, Teoh H, Keung W, Man RY. Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34:822-826. Review.
- Levitan ES, Takimoto K. Dynamic regulation of K^+ channel gene expression in differentiated cells. *J Neuro biol.* 1998; 37: 60-68.
- Li Y J, Duckles SP. Effect of endothelium on the action of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *EUR J Pharmacol.* 1992; 210: 23-40.
- Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol.* 2001; 91: 1421-1430.

- Ling S, Woronuk G, Sy L, Lev S, Braun AP. Enhanced activity of a large conductance, calcium-sensitive K^+ channel in the presence of Src tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 30683-30689.
- Littleton-Kearney M, Hurn PD. Testosterone as a modulator of vascular behavior. *Biol Res Nurs.* 2004; 5: 276-85. Review.
- Liu S, Beckman JS, Ku DD. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 268: 1114-1121.
- Liu Y, Gutterman DD. Oxidative stress and potassium channel function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29: 305-311. Review.
- Liu Y, Terata K, Chai Q, Li H, Kleinman LH, Gutterman DD. Peroxynitrite inhibits Ca^{2+} -activated K^+ channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. *Circ Res.* 2002; 91: 1070-1076.
- Lu T, Ye D, Wang X, Seubert JM, Graves JP, Bradbury JA, Zeldin DC, Lee HC. Cardiac and vascular K_{ATP} channels in rats are activated by endogenous epoxyeicosatrienoic acids through different mechanisms. *J Physiol.* 2006; 575: 627-644.
- Lücher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: Modulator of cardiovascular function. Boca ratón, FL: CRC Press. 1990; 1-23.
- Luczak K, Balcerczyk A, Soszynski M, Bartosz G. Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro. *Cell Biol Int.* 2004; 28: 483-486.
- Luu-The V, Zhang Y, Poirier D, Labrie F. Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995; 55: 581-587.
- Mannhold R. K_{ATP} channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. *Med Res Rev.* 2004; 24: 213-266. Review.
- Marín J, Balfagón G. Effect of clenbuterol on non-endothelial nitric oxide release in rat mesenteric arteries and the involvement of β -adrenoceptors. *Br Pharmacol.* 1998; 124: 473-478.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Age-related changes in vascular responses. *Experimental Gerontology*, 1999; 34: 503-512.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol.* 1995; 15: 279-307. Review.
- Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase. *Methods Enzymol.* 2002; 349: 74-80.
- Maroulis GB, Abraham GE. Ovarian and adrenal contributions to peripheral steroid levels in postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 1976; 48: 150-154.
- Martín MC, Balfagón G, Minoves N, Blanco-Rivero J, Ferrer M. Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric Oxide.* 2005; 12: 163-176.

- Martorell A, Sagredo A, Aras-López R, Balfagón G, Ferrer M. Ovariectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation and nitric oxide release in the rat aorta. *Cardiovas Res*. 2009 (en revisión).
- Massheimer V, Polini N, Alvarez C, Benozzi S, Rauschemberger MB, Sellés J. Signal transduction pathways involved in non genomic action of estrone on vascular tissue. *Steroids*. 2006; 71: 857–864.
- Matharoo-Ball B, Ashford ML, Arulkumaran S, Khan RN. Down-regulation of the alpha- and beta-subunits of the calcium-activated potassium channel in human myometrium with parturition. *Biol Reprod*. 2003; 68: 2135-2141.
- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290: 909-913.
- Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I, Urakami-Harasawa L, Mukai Y, Hirakawa Y, Akaike T, Takeshita A. Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1224-1230.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest*. 2000; 106: 1521-1530.
- Matz RL, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction : potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging*. 2003; 20: 527-550. Review.
- Mehdi MZ, Azar ZM, Srivastava AK. Role of receptor and nonreceptor protein tyrosine kinases in H₂O₂-induced PKB and ERK1/2 signaling. *Cell Biochem Biophys*. 2007; 47: 1-10. Review.
- Meier B. Superoxide generation of phagocytes and nonphagocytic cells. *Protoplasma*. 2001; 217: 117-124.
- Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol*. 2002; 90: 3-6.
- Mendiberri J, Rauschemberger MB, Selles J, Massheimer V. Involvement of phosphoinositide-3-kinase and phospholipase C transduction systems in the non-genomic action of progesterone in vascular tissue. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38: 288-296.
- Meyer MC, Cummings K, Osol G. Estrogen replacement attenuates resistance artery adrenergic sensitivity via endothelial vasodilators. *Am J Physiol*. 1997; 272: 2264-2270.
- Miki T, Seino S. Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38: 917-925. Review.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci*. 1993; 76: 2812-2823.
- Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications *Pharmacol Rev*. 2008; 60: 210-241

- Miller VM, Vanhoutte PM. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. *Am J Physiol.* 1991; 261: 1022-1027.
- Minneman KP. α_1 -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol.* 1988; 40: 87-119.
- Minoves N, Balfagón G, Ferrer M. Role of female sex hormones in neuronal nitric oxide release and metabolism in rat mesenteric arteries. *Clin Sci (Lond).* 2002; 103: 239-247.
- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res.* 2003; 92: e31-40.
- Miyagawa K, Vidgoff J, Hermsmeyer K. Ca^{2+} release mechanism of primate drug-induced coronary vasospasm. *Am J Physiol.* 1997; 272: 2645-2654.
- Mizrachi D, Auchus RJ. Androgens, estrogens, and hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 301:37-42.
- Mohazzab-H KM^a, Kaminski PM, Wolin MS. NADH-oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine endothelium. *Am J Physiol.* 1994; 266: 2568-2572.
- Mohazzab-H KM^b, Wolin MS. Properties of a superoxide anion generating microsomal NADH-oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO_2 sensor. *Am J Physiol.* 1994; 267: 823-831.
- Moien-Afshari F, Kenyon E, Choy JC, Battistini B, McManus BM, Laher I. Long-term effects of ovariectomy and estrogen replacement treatment on endothelial function in mature rats. *Maturitas.* 2003; 45: 213-223.
- Moon SK, Thompson LJ, Madamanchi N, Ballinger S, Papaconstantinou J, Horaist C, Runge MS, Patterson C. Aging, oxidative responses, and proliferative capacity in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280: 2779-2788.
- Moritoki H, Yoshikawa T, Hisayama T, Takeuchi S. Possible mechanisms of age-associated reduction of vascular relaxation caused by atrial natriuretic peptide. *Eur J Pharmacol.* 1992; 210: 61-68.
- Moura MJ, Marcondes FK. Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline. *Life Sci.* 2001; 68: 881-888.
- Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1551-1557.
- Münzel T, Heitzer T, Harrison DG. The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz.* 1997; 22: 158-172
- Murphy JG, Khalil RA. Decreased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291: 44-52.
- Murphy JG, Khalil RA. Gender-specific reduction in contractility and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle cells of female rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 278: 834-844.

- Nagar D, Liu XT, Rosenfeld CR. Estrogen regulates β 1-subunit expression in Ca^{2+} -activated K^{+} channels in arteries from reproductive tissues. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: 1417-1427.
- Namgaladze D, Shcherbyna I, Kienhofer J, Hofer HW, Ullrich V. Superoxide targets calcineurin signaling in vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 334: 1061-1067.
- Nava E, Salazar FJ. Comparative effects of nitric oxide synthesis inhibition and catecholamine treatment in a rat model of endotoxin shock. *Eur J Clin Invest*. 1997; 27: 673-679.
- Nawate S, Fukao M, Sakuma I, Soma T, Nagai K, Takikawa O, Miwa S, Kitabatake A. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. *Br J Pharmacol*. 2005; 144: 178-189.
- Ng WW, Keung W, Xu YC, Ng KF, Leung GP, Vanhoutte PM, Choy PC, Man RY. Genistein potentiates protein kinase A activity in porcine coronary artery. *Mol Cell Biochem*. 2008; 311: 37-44.
- Nie M, Sun ML, He FF, Sun Q, Ge QS. Effects of 17 beta-estradiol on the release of nitric oxide from HUVEC. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2001; 23: 485-489.
- Nielsen KC, Owman C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res*. 1971; 27: 33-42.
- Nimigeen CM, Magleby KL. The β subunit increases the Ca^{2+} sensitivity of large conductance Ca^{2+} -activated potassium channels by retaining the gating in the bursting states. *J Gen Physiol*. 1999; 113: 425-440.
- Ookawara T, Eguchi H, Nishimura M, Kizaki T, Eiji Takayama, Saitoh D, Ohno H, Suzuki K. Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 303: 914-919.
- Orlandi A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Spagnoli LG. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006; 188: 221-230. Review.
- Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286: 233-249 Review.
- Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest*. 1996; 75: 617-636.
- Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol*. 1995; 268: 2274-2280.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. NO release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.
- Papapetropoulos A, Marczin N, Mora G, Milici A, Murad F, Catravas JD. Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension*. 1995; 26: 696-704.

- Park^a WS, Han J, Earm YE. Physiological role of inward rectifier K(+) channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch*. 2008; 457: 137-147.
- Park^b SH, Ramachandran S, Kwon SH, Cha SD, Seo EW, Bae I, Cho C, Song DK. Upregulation of ATP-sensitive potassium channels for estrogen-mediated cell proliferation in human uterine leiomyoma cells. *Gynecol Endocrinol*. 2008; 24: 250-256.
- Paul RJ, Bowman PS, Johnson J, Martin AF. Effects of sex and estrogen on myosin COOH-terminal isoforms and contractility in rat aorta. *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007; 292: 751-757
- Persky AM, Green PS, Stublely L, Howell CO, Zaulyanov L, Brazeau GA, Simpkins JW. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000; 223: 59-66.
- Pinkse MW, Uitto PM, Hilhorst MJ, Ooms B, Heck AJ. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem*. 2004; 76: 3935-3943.
- Ponte A, Sanchez-Ferrer CF, Hernandez C, Alonso MJ, Marin J. Effect of ageing and hypertension on endothelial modulation of ouabain-induced contraction and sodium pump activity in the rat aorta. *J Hypertens* 1996; 14: 705-712.
- Portaluppi F, Pansini F, Manfredini R, Mollica G. Relative Influence of Menopausal Status, Age, and Body Mass Index on Blood Pressure. *Hypertension*, 1997; 29: 976-979.
- Porter VA, Bonev AD, Knot HJ, Heppner TJ, Stevenson AS, Kleppisch T, Lederer WJ, Nelson MT. Frequency modulation of Ca²⁺ sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol*. 1998; 274: 1346-1355.
- Post JM, Gelband CH, Hume JR. [Ca²⁺]_i inhibition of K⁺ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ Res*. 1995; 77: 131-139.
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Synder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995; 267: 24173-24176.
- Prakash YS, Togaibayeva AA, Kannan MS, Miller VM, Fitzpatrick LA, Sieck GC. Estrogen increases Ca²⁺ efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1999; 276: 926-934.
- Qiao X, McConnell KR, Khalil RA. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gend Med*. 2008; 5: 46-64. Review.
- Ranki HJ, Budas GR, Crawford RM, Davies AM, Jovanović A. 17Beta-estradiol regulates expression of K(ATP) channels in heart-derived H9c2 cells. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40: 367-374.
- Rasmussen M, Takuwa Y, Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J*. 1987; 1: 177-185.
- Rauschemberger MB, Sellés J, Massheimer V. The direct action of estrone on vascular tissue involves genomic and non-genomic actions. *Life Sci*. 2008; 82: 115-123.
- Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci*. 2005; 109: 217-226

- Reckelhoff JF, Fortepiani LA. Novel Mechanisms Responsible for Postmenopausal Hipertensión. *Hypertension* 2004; 43: 918-923.
- Reinhard M, Giehl K, Abel K, Haffner C, Jarchau T, Hoppe V, Jockusch BM, Walter U. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 1995; 14: 1583-1589.
- Rendt JM, Toro L, Stefani E, Erulkar SD. Progesterone increases Ca²⁺ currents in myometrial cells from immature and nonpregnant adult rats. *Am J Physiol.* 1992; 262: 293-301.
- Rhodin JA. Architecture of vessel wall. The cardiovascular system II. *Handbook of physiology.* Ed. Bohr DF, Somlyo A, Harvey V, Sparks J American Physiological Society, Bethesda, Maryland. 1980: 1-3.
- Richard D, Rochon L, Deshaies Y. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. *Am J Physiol*, 1987; 253: 740-745.
- Riveiro A, Mosquera A, Calvo C, Alonso M, Macía M, Cores M. Long-term effect of bilateral ovariectomy on endothelial function in aortic rings of spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide. *Gynecol Endocrinol.* 2001; 15: 158-164.
- Rivero-Vilches FJ, de Frutos S, Saura M, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M. Differential relaxing responses to particulate or soluble guanylyl cyclase activation on endothelial cells: a mechanism dependent on PKG-I alpha activation by NO/cGMP. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285:891-898.
- Rodríguez-Martínez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salaíces M, Marín J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol.* 1998;125: 1329-1335.
- Roh S, Choi S, Lim I. Involvement of protein kinase A in nitric oxide stimulating effect on a BK(Ca) channel of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 2533-2538.
- Roveri A, Coassin M, Maiorino M, Zamburlini A, van Amsterdam FT, Ratti E, Ursini F. Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 297: 265-270.
- Rubanyi GM, Botelho LH. Endothelins. *FASEB J.* 1991; 5: 2713-2720.
- Rueckshloss U, Duerschmidt N, Morawietz H. NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2003; 5: 171-1780.
- Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1999; 85: 534-541.
- Rupnow HL, Phernetton TM, Shaw CE, Modrick ML, Bird IM, Magness RR. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VII. Estrogen and progesterone effects on eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280: 1699-1705.
- Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 5930-5935.

- Ruth P, Landgraf W, Keilbach A, May B, Egleme C, Hofmann F. The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem.* 1991; 202: 1339-1344.
- Ruth P, Pfeifer A, Kamm S, Klatt P, Dostmann WR, Hofmann F. Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase Ialpha. *J Biol Chem.* 1997; 272: 10522-10528.
- Rutkowski R, Pancewicz SA, Rutkowski K, Rutkowska J. Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process. *Pol Merkur Lekarski.* 2007; 23: 131-136. Review.
- Sakuma I, Liu MY, Sato A, Hayashi T, Iguchi A, Kitabatake A, Hattori Y. Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 48-54.
- Sasaki H, Okabe E. Modification by hydroxyl radicals of functional reactivity in rabbit lingual artery. *Jpn J Pharmacol.* 1993; 62: 305-314.
- Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 1191-1212.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature.* 2000; 404: 197-201.
- Scholten A, Aye TT, Heck AJ. A multi-angular mass spectrometric view at cyclic nucleotide dependent protein kinases: in vivo characterization and structure/function relationships. *Mass Spectrom Rev.* 2008; 27: 331-353.
- Schounbaum GR, Chance B. Catalase. In *The enzymes*, ed P.D. Boyer, 2nd edn Vol XIII: 363-408. New York Academy.
- Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol.* 1992; 105: 575-580.
- Scornik FS, Toro L. U46619, a thromboxane A2 agonist, inhibits KCa channel activity from pig coronary artery. *Am J Physiol.* 1992; 262: 708-713.
- Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Nongenomic action of progesterone in rat aorta: role of nitric oxide and prostaglandins. *Cell Signal.* 2002; 14: 431-436.
- Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Novel action of estrone on vascular tissue: regulation of NOS and COX activity. *Steroids.* 2005; 70: 251-256.
- Shaw A, Vospar AJ. Solubility of nitric oxide in aqueous and nonaqueous solvent. *Jchem Sci Faraday y Trans.* 1977; 8: 1239-1244.
- Sheehan M, Wong HR, Hake PW, Malhotra V, O'Connor M, Zingarelli B. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol Pharmacol.* 2002; 61: 953-963.
- Sheehy AM, Burson MA, Black SM. Nitric oxide exposure inhibits endothelial NOS activity but not gene expression: a role for superoxide. *Am J Physiol.* 1998; 274: 833-841.

- Shi Y, Chen X, Wu Z, Shi W, Yang Y, Cui N, Jiang C, Harrison RW. cAMP-dependent protein kinase phosphorylation produces interdomain movement in SUR2B leading to activation of the vascular KATP channel. *J Biol Chem*. 2008; 283: 7523-7530.
- Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res*. 2004 Jun;49(6):543-9. Review.
- Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26: 335-343.
- Sibonga JD, Lotinun S, Evans GL, Pribluda VS, Green SJ, Turner RT. Dose-response effects of 2-methoxyestradiol on estrogen target tissues in the ovariectomized rat. *Endocrinology*. 2003; 144: 785-792
- Siiteri PK, MacDonald PC. Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1966; 26: 751-761.
- Singh U, Devaraj S, Vasquez-Vivar J, Jialal I. C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 43: 780-791.
- Smith CW, Pritchard K, Marston SB. The mechanism of Ca^{2+} regulation of vascular smooth muscle in filaments by caldesmon and calmodulin. *J Biol Chem*. 1987; 262: 116-122.
- Smith JA, Francis SH, Walsh KA, Kumar S, Corbin JD. Autophosphorylation of type Ibeta cGMP-dependent protein kinase increases basal catalytic activity and enhances allosteric activation by cGMP or cAMP. *J Biol Chem*. 1996; 271: 20756-20762.
- Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K^+ channels. *Stroke*. 1997; 28: 2290-2294
- Sotníková R. Investigation of the mechanisms underlying H_2O_2 -evoked contraction in the isolated rat aorta. *Gen Pharmacol*. 1998; 31: 115-119.
- Speir E, Yu ZX, Takeda K, Ferrans VJ, Cannon RO 3rd. Antioxidant effect of estrogen on cytomegalovirus-induced gene expression in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*. 2000; 102: 2990-2996.
- Spinetti G, Wang M, Monticone R, Zhang J, Zhao D, Lakatta EG. Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 1397-1402.
- Stauffer BL, Westby CM, DeSouza CA. Endothelin-1, aging and hypertension. *Curr Opin Cardiol*. 2008; 23: 350-355. Review.
- Stice JP, Eiserich JP, Knowlton AA. Role of aging versus the loss of estrogens in the reduction in vascular function in female rats. *Endocrinology*. 2009; 150 :212-219.
- Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*. 2003; 93: 170-177.

- Szmulowicz ED, Adler GK, Ricchiuti V, Hopkins PN, Seely EW. Relationships between endogenous sex hormone concentrations and vascular function in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 4738-4741.
- Tan E, Gurjar MV, Sharma RV, Bhalla RC. Estrogen receptor-alpha gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. *Cardiovasc Res.* 1999; 43: 788-797.
- Tanaka M, Umemoto S, Kawahara S, Kubo M, Itoh S, Umeji K, Matsuzaki M. Angiotensin II type 1 receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor altered the activation of Cu/Zn-containing superoxide dismutase in the heart of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2005; 28: 67-77.
- Tang EH, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics.* 2008; 32: 409-418.
- Tang XD, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11: 171-178.
- Tantini B, Manes A, Fiumana E, Pignatti C, Guarnieri C, Zannoli R, Branzi A, Galié N. Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 2005; 100: 131-138.
- Tao J, Tu YT, Li JW, Feng AP, Huang CZ, Wu Y, Shen GX. Endogenous production of nitric oxide contributes to proliferation effect of vascular endothelial growth factor-induced malignant melanoma cell. *Clin Exp Dermatol.* 2006; 31: 94-99.
- Taylor MS, Okwuchukwasanya C, Nickl CK, Tegge W, Brayden JE, Dostmann WR. Inhibition of cGMP-dependent protein kinase by the cell-permeable peptide DT-2 reveals a novel mechanism of vasoregulation. *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 1111-1119.
- Teede H, Van Der Zyp A, Majewski H. Gender differences in protein kinase G-mediated vasorelaxation of rat aorta. *Clin. Sci. (Lond)*, 2001; 100: 473-479
- Teede HJ. Sex hormones and the cardiovascular system: effects on arterial function in women. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; 34: 672-676.
- Tejera N, Balfagón G, Marín J, Ferrer M. Gender differences in the endothelial regulation of alpha2-adrenoceptor-mediated contraction in the rat aorta. *Clin Sci (Lond)*. 1999; 97: 19-25.
- Tennant BP, Cui Y, Tinker A, Clapp LH. Functional expression of inward rectifier potassium channels in cultured human pulmonary smooth muscle cells: evidence for a major role of Kir2.4 subunits. *J Membr Biol.* 2006; 213: 19-29.
- Timenermans PBMW, Chiu AT, Thoolen MJMC. Calcium handling in vasoconstriction to stimulation of alpha1 and alpha2-adrenoceptors. *Can J Physiol Pharmacol.* 1987; 65: 1649-1657.

- Torrecillas G, Boyano-Adánez MC, Medina J, Parra T, Grier M, López-Ongil S, Arilla E, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol*. 2001; 59: 104-112.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122: 339-352.
- Tresguerres J.A.F. *Fisiología humana*, 3ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2000
- Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T, Lüscher TF. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest*. 1996; 98: 899-905.
- Tschugguel W, Stonek F, Zhegu Z, Dietrich W, Schneeberger C, Stimpfl T, Waldhoer T, Vycudilik W, Huber JC. Estrogen increases endothelial carbon monoxide, heme oxygenase 2, and carbon monoxide-derived cGMP by a receptor-mediated system. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 3833-3839.
- Tusnády GE, Bakos E, Váradi A, Sarkadi B. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* 1997; 402: 1-3.
- Uddin M, Yang H, Shi M, Polley-Mandal M, Guo Z. Elevation of oxidative stress in the aorta of genetically hypertensive mice. *Mech Ageing Dev*. 2003; 124: 811-817.
- Uhler MD. Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem*. 1993; 268: 13586-13591.
- Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989; 2: 997-1000.
- van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Lüscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000; 192: 1731-1744.
- Van Riper DA, McDaniel NL, Rembold CM. Myosin light chain kinase phosphorylation in nitrovasodilator induced swine carotid artery relaxation. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1355: 323-330.
- Vargas F, Osuna A, Fernández-Rivas A. Abnormal renal vascular reactivity to acetylcholine and nitroprusside in aging rats. *Gen Pharmacol*. 1997; 28: 133-137
- Vedernikov YP, Liao QP, Jain V, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. Effect of chronic treatment with 17beta-estradiol and progesterone on endothelium-dependent and endothelium-independent relaxation in isolated aortic rings from ovariectomized rats. *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 176: 603-608.
- Vermeulen A. The hormonal activity of the postmenopausal ovary. 48: 150-154. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976; 42: 247-253.
- Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. The aging endothelium, cardiovascular risk and disease. *Exp Physiol*. 2009; 94: 317-321.

- Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F, Hofmann F, Casteels R. Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasmalemmal Ca^{2+} pump of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol. *Biochem J*. 1988; 255: 855-863.
- Wang H, Long C, Duan Z, Shi C, Jia G, Zhang Y. A new ATP-sensitive potassium channel opener protects endothelial function in cultured aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2007; 73: 497-503.
- Wang HD, Johns DG, Xu S, Cohen RA. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282: 1697-1702.
- Wang TH, Yang D, Liu PQ, Gong SZ, Lu W, Pan JY. 17 β -estradiol induced nitric oxide release in vascular endothelial cells. *Sheng Li Xue Bao*. 2000; 52: 479-482.
- Wang X, Barber DA, Lewis DA, McGregor CG, Sieck GC, Fitzpatrick LA, Miller VM. Gender and transcriptional regulation of NO synthase and ET-1 in porcine aortic endothelial cells. *Am J Physiol*. 1997; 273: 1962-1967.
- Wang X, Hope S, Du Y. Paracrine role of adventitial superoxide anion in a model of genetic hypertension. Role of endothelium. *Hypertension*, 1999; 33: 1353-1358
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004; 44: 381-386.
- Watanobe H, Yoneda M. A mechanism underlying the sexually dimorphic ACTH response to lipopolysaccharide in rats: sex steroid modulation of cytokine binding sites in the hypothalamus. *J Physiol*. 2003; 547: 221-232.
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 5212-5216.
- Weiner CP, Thompson LP. Nitric oxide and pregnancy. *Semin Perinatol*. 1997; 21: 367-380.
- Welch G, Loscalzo J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg*. 1999; 9: 361-371.
- Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca^{2+} -dependent K^{+} channels. *Circ Res*. 1996; 79: 1024-1030.
- Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F. The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett*. 1989; 251: 191-196.
- Wever RM, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 1998; 97: 108-112.
- White RE, Darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK_{Ca} channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res*. 1995; 77: 936-942.
- White^a RE, Kryman JP, El-Mowafy AM, Han G, Carrier GO. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate $\text{BK}(\text{Ca})$ channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000; 86: 897-905.

- Wight^b E, Küng CF, Moreau P, Takase H, Bersinger NA, Lüscher TF. Aging, serum estradiol levels, and pregnancy differentially affect vascular reactivity of the rat uterine artery. *J Soc Gynecol Investig.* 2000; 7: 106-113.
- Wiklund NP, Celtek S, Leone AM, Inversen HH, Gustafsson LE, Brundin L, Frust VW, Flock A, Moncada S. Visualisation of nitric oxide released by nerve stimulation. *J Neurosci Res.* 1997; 47: 224-232.
- Wolin MS, Burke-Wolin TM, Mohazzab-H KM. Role for NAP(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir Physiol.* 1999; 115: 229-238.
- Wolin MS, Davidson CA, Kaminski PM, Fayngersh RP, Mohazzab-H KM. Oxidant-nitric oxide signalling mechanisms in vascular tissue. *Biochemistry (Mosc).* 1998; 63: 810-816.
- Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res.* 2002; 39:191-207.
- Wolin MS. Interaction of oxidantes with vascular signaling system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1430-1442.
- Wong CM, Yao X, Au CL, Tsang SY, Fung KP, Laher I, Vanhoutte PM, Huang Y. Raloxifene prevents endothelial dysfunction in aging ovariectomized female rats. *Vascul Pharmacol.* 2006; 44: 290-298.
- Wu L, Einstein M, Geissler WM, Chan HK, Elliston KO, Andersson S. Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem.* 1993; 268: 12964-12969.
- Wu^a BN, Luykenaar KD, Brayden JE, Giles WR, Corteling RL, Wiehler WB, Welsh DG. Hyposmotic challenge inhibits inward rectifying K⁺ channels in cerebral arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: 1085-1094.
- Wu^b S, Ruan Y, Yin M, Lai W. Research on the age-related changes in the nitric oxide pathway in the arteries of rats and the intervention effect of dehydroepiandrosterone. *Gerontology.* 2007; 53: 234-237.
- Xu H, Pritchard KA Jr. Targeted increases in endothelial cell superoxide anion production stimulate eNOS-dependent nitric oxide production, not uncoupled eNOS activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1580-1581.
- Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation.* 2003; 107: 1040-1045.
- Yamaguchi K, Honda H, Wakisaka C, Tohei A, Kogo H. Effects of phytoestrogens on acetylcholine- and isoprenaline-induced vasodilation in rat aorta. *Jpn J Pharmacol.* 2001; 87: 67-73.
- Yano S, Yano N. Regulation of catalase enzyme activity by cell signaling molecules. *Mol Cell Biochem.* 2002; 240: 119-130.

- Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Naito S, Ohtsuru A, Yamamoto T, Kuroiwa Y. Stimulation of in vivo angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci.* 1999; 64: 249-258.
- Yildiz O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1100: 353-360. Review.
- Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001; 38: 1395-1399.
- Zamorano B, Bruzzzone ME, Martinez JL. Vascular smooth muscle reactivity to norepinephrine in ovariectomized rats: relationship to vascular PGE₂/PGF₂ alpha ratio. *Gen Pharmacol.* 1995; 26: 1613-1618.
- Zhang M, Wang GJ, Benishin CG, Pang PK. Rapid effect of progesterone on the contraction of rat aorta in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54: 1529-1534.
- Zhou SH, Ling HY, Tian SW, Liu XQ, Wang BX, Hu B. 17beta-estradiol protects against injury of aortic relaxation and contraction in ovariectomized rats with insulin resistance induced by fructose. *Sheng Li Xue Bao.* 2005; 57: 627-635.
- Zhou XB, Ruth P, Schlossmann J, Hofmann F, Korth M. Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1996; 271: 19760-19767.
- Zhu S, Han G, White RE. PGE₂ action in human coronary artery smooth muscle: role of potassium channels and signaling cross-talk. *J Vasc Res.* 2002; 39: 477-488.
- Zieman SJ, Gerstenblith G, Lakatta EG, Rosas GO, Vandegaer K, Ricker KM, Hare JM. Upregulation of the nitric oxide-cGMP pathway in aged myocardium: physiological response to L-arginine. *Circ Res.* 2001; 88: 97-102.
- Zonta F, Barbieri A, Reguzzoni M, Calligaro A. Quantitative changes in pharmacodynamic parameters of noradrenaline in different rat aorta preparations: influence of endogenous EDRF. *J Auton Pharmacol.* 1998; 18: 129-138.